

**Identifizierung, Charakterisierung und biokombinatorische
Anwendung von Kommunikations-vermittelnden Domänen in
nichtribosomalen Peptidsynthetasen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martin Hahn
aus Pforzheim

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am 20. Dezember 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2004

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Hahn, M. & Stachelhaus, T. (2004) Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains, *Proc Natl Acad Soc*, **101**, 15585-15590.

Hahn, M. & Stachelhaus, T (2004) Kommunikations-vermittelnde Domänen in nichtribosomalen Peptidsynthetasen und deren Verwendung zur Generierung neuartiger Peptidantibiotika, *Deutsches Patent eingereicht*, Pat.-Nr.: 102004043629.0

ZUSAMMENFASSUNG

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) katalysieren die Synthese strukturell komplexer und pharmakologisch relevanter Peptid-Wirkstoffe. Durch die Bildung von Multienzymkomplexen überwinden sie u.a. Limitationen einer Diffusionskontrollierten Substratbindung und vermeiden die Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Ungeklärt hierbei war jedoch, wie in einem multienzymatischen Biosynthese-Komplex die produktive Interaktion zwischen Partner-NRPS vermittelt und gleichzeitig eine unproduktive Interaktion zwischen Nichtpartner-Enzymen verhindert wird. Die molekulare Basis dieser selektiven Protein-Protein-Kommunikation ist für das Verständnis der Synthese eines Naturstoffes, aber auch die Generierung hybrider Biosynthese-Systeme von großer Bedeutung und wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Auf der Basis von Deletionsstudien und Domänen austausch Experimenten konnten die für die intermolekulare Kommunikation verantwortlichen Bereiche identifiziert werden. Diese Kommunikations-vermittelnden (COM)-Domänen wurden an den Termini der entsprechenden NRPSs lokalisiert. Die am C-Terminus eines Donorenzyms gelegene COM^D-Domäne und die am N-Terminus des Akzeptorenzyms gelegene COM^A-Domäne bilden hierbei ein kompatibles COM-Domänenpaar, welches essentiell und hinreichend für die Vermittlung der spezifischen Protein-Protein-Interaktion ist. Es konnte gezeigt werden, dass kompatible COM-Domänenpaare verwendet werden können, um eine Kommunikation zwischen Nichtpartner-NRPSs oder einen Crosstalk zwischen NRP-Biosynthese-Systemen zu etablieren.

Die Analyse von COM-Domänen zeigte, dass diese vermutlich eine α -helicale Struktur besitzen und ihre transiente Interaktion über polare und geladene Aminosäure-Reste vermittelt wird. Auf der Basis von *in silico*-Analysen konnte ein Modell aufgestellt werden, wonach fünf Aminosäure-Paare zwischen COM^D- und COM^A-Domänen über Interaktion oder Nichtinteraktion zwischen zwei NRPS entscheiden. Die Validität des aufgestellten Modells wurde u.a. durch gerichtete Punktmutagenese unter Beweis gestellt.

Aufgrund ihrer nachgewiesenen Portabilität besitzen COM-Domänen ein enormes biokombinatorisches Potential und eröffnen bisher nicht vorhandene Möglichkeiten zum rationalen Design artifizierlicher NRP-Biosynthese-Komplexe.

1	ABKÜRZUNGEN	1
2	EINLEITUNG	6
2.1	ANTIBIOTIKA – GESTERN, HEUTE UND MORGEN	6
2.2	NICHTRIBOSOMAL SYNTHETISIERTE NATURSTOFFE	8
2.3	DIE NICHTRIBOSOMALEN PEPTIDSYNTHEASEN	10
2.3.1	<i>Die Domänenorganisation in nichtribosomalen Peptidsynthetasen.....</i>	<i>10</i>
2.4	DAS PEPTIDANTIBIOTIKUM TYROCIDIN A	17
2.4.1	<i>Die Biosynthese des Peptidantibiotikums Tyrocidin A.....</i>	<i>19</i>
2.5	KOMMUNIKATION IN NICHTRIBOSOMALEN PEPTIDSYNTHEASEN	20
2.6	WARUM MULTIENZYMKOMPLEXE?	22
2.7	KOMMUNIKATION UND INTERAKTION IN MULTIENZYMKOMPLEXEN.....	22
2.7.1	<i>Die Enzymklasse E3 der Ubiquitin Proteinligasen.....</i>	<i>24</i>
2.7.2	<i>Die Polyketidsynthasen (PKS).....</i>	<i>27</i>
2.8	AUFGABENSTELLUNG	30
3	MATERIAL.....	31
3.1	GERÄTE	31
3.2	CHEMIKALIEN, ENZYME UND LABORPRODUKTE	32
3.3	MIKROORGANISMEN	33
3.3.1	<i>E. coli XL1-Blue.....</i>	<i>33</i>
3.3.2	<i>E. coli XL10-Gold.....</i>	<i>33</i>
3.3.3	<i>E. coli TOP10.....</i>	<i>33</i>
3.3.4	<i>E. coli DH5α.....</i>	<i>33</i>
3.3.5	<i>E. coli M15.....</i>	<i>33</i>
3.3.6	<i>E. coli BL21</i>	<i>34</i>
3.3.7	<i>E. coli HM0079</i>	<i>34</i>
3.3.8	<i>Bacillus brevis ATCC 8185.....</i>	<i>34</i>
3.3.9	<i>Bacillus subtilis ATCC 21332</i>	<i>34</i>
3.3.10	<i>Bacillus subtilis ATCC 6633</i>	<i>34</i>
3.3.11	<i>Bacillus licheniformis ATCC 10716.....</i>	<i>34</i>
3.4	VEKTOREN	35
3.4.1	<i>pTrcHis-TOPO[®] und pTrcHis2-TOPO[®].....</i>	<i>35</i>
3.4.2	<i>pQE60</i>	<i>35</i>

3.4.3	<i>pQE70</i>	36
3.4.4	<i>pREP4 und pREP4-gsp</i>	36
3.4.5	<i>pSU18</i>	36
3.5	MEDIEN	37
4	METHODEN	38
4.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	38
4.1.1	<i>Konstruktion der Plasmide</i>	38
4.1.1.1	Plasmide der C-terminalen Verkürzungsmutanten und des COM-Domänenprojektes	39
4.1.1.2	Plasmide des Zweiplasmidsystems	43
4.1.1.3	Plasmide zur Mutationsanalyse von COM-Domänen	43
4.1.1.4	Plasmide des Universellen Kommunikationssystems (UKS)	44
4.1.2	<i>DNA-Sequenzierung</i>	46
4.2	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	46
4.2.1	<i>Genexpression im pTrcHis-TOPO-Vektor-System</i>	46
4.2.2	<i>Zellaufschluss</i>	47
4.2.3	<i>Proteinreinigung mittels Ni^{2+}-NTA-Affinitätschromatographie</i>	47
4.2.4	<i>Reinigung der rekombinanten NRPS-Synthetasen</i>	49
4.3	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG – AKTIVITÄTSTESTS	50
4.3.1	<i>ATP-PP_i-Austauschreaktion</i>	50
4.3.2	<i>Beladung von NRPSs mit radioaktiv-markierten Aminosäuren</i>	51
4.3.3	<i>Posttranslationale Modifikation in vitro</i>	52
4.3.4	<i>Epimerisierungsassay</i>	53
4.4	PRODUKTANALYTIK	54
4.4.1	<i>Radioaktiver DKP-Bildungsassay</i>	54
4.4.2	<i>HPLC-Analytik</i>	54
5	ERGEBNISSE	57
5.1	EINFLUSS DES C-TERMINUS VON TYCA AUF DIE PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTION MIT DEM PARTNERENZYM TYCB1	59
5.1.1	<i>Konstruktion, Überproduktion und Reinigung C-terminaler Verkürzungsmutanten von TycA</i>	59
5.1.2	<i>Biochemische Analyse der C-terminalen Verkürzungsmutanten</i>	60
5.1.2.2	<i>In vitro-Modifikation und Beladungsreaktion</i>	61

5.1.3	<i>Elongationsaktivität und Dipeptidbildung</i>	62
5.1.4	<i>Einfluss C-terminaler Verkürzungsmutanten auf die Epimerisierungsaktivität</i>	64
5.1.5.	<i>in vivo Untersuchung C-terminaler Verkürzungsmutanten von TycA im Zweiplasmidsystem</i>	67
5.1.6	<i>Einfluss des C-Terminus auf die Interaktion im System TycA/TycB1</i> ...	68
5.2	CHARAKTERISIERUNG UND UNTERSUCHUNG DER KOMMUNIKATION VERMITTELNDEN DOMÄNEN (COM-DOMÄNEN).....	69
5.2.3	<i>Produktbildung zwischen Partner- und Nichtpartner NRPSs</i>	74
5.2.4	<i>Quantifizierung der Dipeptidbildung im System TycA/TycB1</i>	76
5.3	MUTATIONS- UND DELETIONSSTUDIEN DER E-DOMÄNE UND DEREN EINFLUSS AUF DIE DIPEPTIDBILDUNG IM SYSTEM TYCA/TYCB1	78
5.4	CROSS-TALK ZWISCHEN UNTERSCHIEDLICHEN NICHTTRIBOSOMALEN BIOSYNTHESESYSTEMEN.....	82
5.4.1	<i>Interaktion zwischen Synthetasen aus unterschiedlichen Biosynthesystemen – „Cross-talk“ und „proof of principle“</i>	84
5.4.2	<i>COM-Domänen vermittelte Produktbildung im System TycA/SrfAC und GrsA/SrfAC</i>	86
5.5	UNTERSUCHUNG VON COM-DOMÄNENMUTANTEN	89
5.5.1	<i>Identifizierung putativer kommunikationsfördernder Aminosäure-reste und Konstruktion einer COM-Domänenmutante</i>	89
5.5.2	<i>Biochemische Analyse von C1(TycB1) K9D und Produktbildung</i>	91
5.6	AUFBAU EINES UNIVERSELLEN KOMMUNIKATIONSSYSTEMS (UKS)	94
5.6.1	<i>Konstruktion des universellen Kommunikationsvektors</i>	95
5.6.2	<i>Konstruktion und biochemische Charakterisierung eines Elongationsmoduls für das Universelle Kommunikationsmodell</i>	97
5.6.3	<i>Produktbildung im Universellen Kommunikationssystem</i>	99
6	DISKUSSION	102
6.1	IDENTIFIKATION VON NRPS COM-DOMÄNEN.....	103
6.2	UNIVERSALITÄT VON COM-DOMÄNEN	106
6.2.1	<i>Homologie und Crosstalk</i>	107
6.2.2	<i>Strukturelle Analyse von COM-Domänen</i>	108
6.3	BEDEUTUNG EINZELNER AMINOSÄURERESTE FÜR DIE INTERAKTION ZWEIER COM-DOMÄNEN	112

6.4	COM-DOMÄNEN-VERMITTELTE BIOKOMBINATORISCHE PEPTID-SYNTHESE	118
6.5	VERGLEICH ZWISCHEN NRPS-COM- UND PKS-DOCKING-DOMÄNEN	121
6.6	NÄCHSTE SCHRITTE - EIN KURZER AUSBLICK	123
7	LITERATUR	125
8	ANHANG	137
8.1	VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	137
8.2	BIOSYNTHESESYSTEME	138
8.3	DIE KONSERVIERTEN <i>CORE</i> -MOTIVE DER NRPS-DOMÄNEN	139

1 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A-Domäne	Adenylierungs-Domäne
ACP-Domäne	Acyl-Carrier-Protein-Domäne
ACV	δ -(α -Aminoadipyl)-Cysteiny-D-Valin
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ArCP-Domäne	Aryl-Carrier-Protein-Domäne
AS	Aminosäure
ATCC	Stammsammlung (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bac	Bacitracin
bp	Basenpaar
<i>bla</i>	Ampicillin-Resistenz-Kassette (kodierendes Gen der β -Lactamase)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (kodierendes Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase)
C-Domäne	Kondensations-Domäne
Cm	Chloramphenicol
CoASH	Coenzym A (<i>coenzyme A</i>)
COM-Domäne	Kommunikation-vermittelnde Domäne (<i>communication mediating domain</i>)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
Cy-Domäne	Heterozyklisierungs-Domäne (<i>cyclization domain</i>)
d	Tag(e)
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dNTP	2'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DEBS	6-Desoxyerythronilid B-Synthase
DHB	2,3-Dihydroxy-Benzoat
DKP	Diketopiperazin

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>desintegrations per minute</i>)
DTE	1,4-Dithioerythrol
DTT	1,4-Dithiothreitol
E-Domäne	Epimerisierungs-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylendiamintetraacetat</i>)
EtOH	Ethanol
ESI	Elektronen-Spray-Ionisierung
F-Domäne	Formylierungs-Domäne
FAS	Fettsäuresynthase
Fen	Fengycin
FMN	Flavin-Mononucleotid
FPLC	schnelle Flüssigkeits-Chromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
g	Gramm
G	Guanin
Grs	Gramicidin S
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isoprenyl-β-D-thiogalaktosid
IU	internationale Einheiten (<i>international units</i>)
k	kilo
<i>kan</i>	Kanamycin-Resistenz-Kassette
kb	Kilobasenpaare
K _m	Kanamycin
K _M	Michaelis-Menten Konstante
L	Liter
LSC	Szintillationszähler (<i>liquid szintillation counter</i>)
m	Meter oder <i>milli</i> (10 ⁻³) in Verbindung mit weiteren Maßeinheiten

M	molar (mol/L)
μ	<i>micro</i> (10^{-6})
MCS	multipler Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>)
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
Myc	Mycosubtilin
n	<i>nano</i> (10^{-9})
<i>neo</i>	Neomycin-Resistenz-Kassette
Nm	Neomycin
MMt-Domäne	N-Methylierungs-Domäne
NRP	nichtribosomale Peptide
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriacetat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p	<i>pico</i> (10^{-12})
Ppant	4'-Phosphopantethein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCP-Domäne	Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PKS	Polyketidsynthase
<i>P_n</i>	<i>n</i> -Promotor
PP _i	anorganisches Pyrophosphat (<i>inorganic pyrophosphate</i>)
R	organischer Rest
RBS	ribosomale Bindungsstelle
Red-Domäne	Reduktase-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosylmethionin

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
Sfp	PPTase des Surfactin-Systems aus <i>Bacillus subtilis</i> (<i>surfactin production</i>)
SNAC	<i>N</i> -Acetyl-Cysteamin-Thioester (<i>thioesterfied N-acetyl cysteamin</i>)
Srf	Surfactin
T	Thymin
Tc	Tetracyclin
Tell	TypII-Thioesterase
Te-Domäne	Thioesterase-Domäne
<i>tet</i>	Tetracyclin-Resistenz-Kassette
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetate</i>)
TLC	Dünnschichtchromatographie (<i>thin-layer chromatography</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
Tyc	Tyrocidin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
Vib	Vibriobactin
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp

Tabelle 1.1: Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code	Molekulargewicht (g/mol)
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

2 EINLEITUNG

2.1 Antibiotika – Gestern, Heute und Morgen

Antibiotika sind nach der ursprünglich auf Waksman [Waksman, 1949] zurückgehenden Definition niedermolekulare Stoffwechselprodukte (Metabolite) von Mikroorganismen, die das Wachstum anderer Mikroorganismen inhibieren, jedoch auf den Produzenten selbst nicht wirken.

Besonders die Entwicklung der Antibiotikatherapie nach dem zweiten Weltkrieg hatte an der Kontrolle und Ausrottung epidemischer Erkrankungen und den Anstieg der Lebenserwartung in den Industrieländern wesentlichen Anteil. Neue Anwendungen für Antibiotika in nichttherapeutischen Bereichen wie der Tieraufzucht (Ergotropika) oder dem Pflanzenschutz (Herbizide) wurden ebenso erschlossen, wie die Produktion pharmakologisch wirksamer Stoffe (z.B. Immunsuppressiva, Antitumorale, Antihypertensiva, Mykotoxine u.a). Antibiotika spielen ferner eine wichtige Rolle als „biochemische Werkzeuge“ in der Molekularbiologie (Enzyminhibitoren) und bei der Erforschung von Zellfunktionen (Phytotoxine, Antimetabolite) (Abb. 2.1).



Abb. 2.1: Einsatzgebiete mikrobieller Wirkstoffe

Der heutige Stand der Antibiotikaforschung ist die Konsequenz einer kontinuierlichen Entwicklung, deren Beginn durch die Entdeckung der Hemmwirkung einer Schimmelpilzkolonie (*Penicillium notatum*) gegenüber Staphylokokken durch den britischen Bakteriologen Alexander Fleming (1928) markiert wird [Fleming, 1929]. Phänomenologisch betrachtet muss man die Geschichte der Antibiotika wahrscheinlich viel früher beginnen lassen. So ist die Verwendung von verschimmeltem Brot oder Maisbrei für die topische Wundbehandlung schon in der Volksmedizin des alten Ägypten und China bekannt gewesen.

Die Gewinnung von Antibiotika und anderen pharmakologisch relevanten Verbindungen erfolgt in der heutigen Zeit neben der traditionellen chemischen Synthese vor allem durch Fermentation von Mikroorganismen. Als Produzenten dieser Naturstoffe treten hauptsächlich Bakterien der Spezies *Actinomyces*, aber auch andere Prokaryoten und Eukaryoten, wie z.B. Pilze in Erscheinung. Die zumeist dem Sekundärmetabolismus der Naturstoffproduzenten entstammenden Verbindungen zeichnen sich durch enorme strukturelle und hohe funktionelle Vielfalt aus. Gerade diese Vielfalt ist es, die diese Naturstoffe zu wichtigen Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe macht. Zu den pharmakologisch bedeutendsten Vertretern der natürlichen Antibiotika zählen heute Penicilline, Cephalosporine, Cyclosporine und Glykopeptide.

Anfang der 50er Jahre wurden die ersten Antibiotika-resistenten Bakterienstämme identifiziert. Resistenzen betrafen zunächst nur das Penicillin, nachfolgend jedoch auch vermehrt andere, pharmakologisch-relevante Antibiotika wie z.B. Aminoglykosid, Tetracyclin, Erythromycin und Chloramphenicol. Mittlerweile sehen wir uns mit multiresistenten Erregern konfrontiert, die sich als Folge von Mutationen oder durch Aufnahme resistenzvermittelnder Fremd-DNA gebildet haben [Walsh 2000]. So ist es aufgrund der enormen Anpassungsfähigkeit von Mikroorganismen lediglich eine Frage der Zeit, wann eine klinisch-relevante Resistenz gegen ein neues Antibiotikum beobachtet wird.

Der Ausbreitung multiresistenter Krankheitserreger kann nur durch die stetige Entwicklung neuer Antibiotika begegnet werden. Da die Entdeckung eines völlig neuartigen Antibiotikums äußerst selten ist, beschränken sich die weitaus meisten Ansätze auf eine Veränderung und Verbesserung bereits bekannter Wirkstoffe. Derartig veränderte Naturstoffen können sowohl semisynthetisch [Schreiber, 1998], als auch durch eine Manipulation der natürlichen Biosyntheseweges im

Produzentenstamm generiert werden [Marahiel 1997, von Döhren, 1997, Walsh, 2002].

So vielfältig Struktur und Funktion von Naturstoffen sind, so unterschiedlich ist auch deren Synthese. Die Biosynthese vieler pharmakologisch-relevanter Wirkstoffe erfolgt an großen multimodularen Enzymen oder Enzymkomplexen, den Polyketidsynthasen (PKS) oder den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS). Diese, einem natürlichen Montageband nicht unähnlichen Biosynthesemaschinerien, bieten ein enormes Potential für die Produktion, aber auch die gezielte Manipulation von Naturstoffen.

2.2 Nichtribosomal synthetisierte Naturstoffe

Nichtribosomal synthetisierte Naturstoffe werden von einer Reihe Bakterien und filamentöser Pilze an multimodularen Enzymen, den sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen gebildet. Schon die Bezeichnung nichtribosomal impliziert einen zur „normalen“ ribosomalen Proteinbiosynthese alternativen Verlauf. Im Unterschied zur ribosomalen Proteinsynthese, die ausschließlich proteinogene Aminosäuren verwendet, können bei der nichtribosomalen Peptidsynthese auch deren strukturelle Analoga (Isomere, Enantiomere, Derivate usw.) genutzt werden. Des Weiteren treten Modifikationen wie Methylierungen, Acylierungen, Glykosylierungen und Heterozyklisierung auf und es werden neben linearen auch zyklisch und verzweigt-zyklische Strukturen gebildet [Schwarzer et al., 2004]. Alle diese strukturellen Besonderheiten tragen zur Stabilität und biologischen Aktivität der synthetisierten Peptid-Produkte bei.

Zu den nichtribosomal produzierten Naturstoffen gehört der Tripeptid-Precursor δ -(α -Aminoadipyl)-L-Cysteiny-D-Valin (ACV) (**1**), aus dem sich die bekanntesten Antibiotika, Penicilline und Cephalosporine, ableiten [Byford et al., 1997]. Weitere Vertreter nichtribosomal synthetisierter Peptidantibiotika sind das Tyrocidin A (**3**) [Mootz und Marahiel, 1997], das als Reserveantibiotikum bekannte Vancomycin (**4**) [Hubbard and Walsh, 2003, van Wageningen et al, 1998] und das Bacitracin (**2**) [Konz et al., 1997]. Darüber hinaus werden Immunsuppressiva wie das Cyclosporin A (**5**) [Weber et al., 1994] oder das als Biotensid wirkende und hämolytische Aktivität besitzende Surfactin (**8**) auf diese Weise produziert.

Bacillibactin (**10**) [May et al., 2001] und Yersiniabactin (**9**) [Gehring et al., 1998; Miller et al., 2002] sind Vertreter von Siderophoren, die unter Eisenmangelbedingungen vom Produzentenstamm gebildet werden. Letzteres gehört ebenso wie die in der Krebstherapie eingesetzten Naturstoffe Bleomycin (**6**) [Shen et al., 2002; Du et al., 2000] und Epothilon (**7**) [Molnar et al., 2000; Tang et al., 2000] zur Klasse gemischter NRPS/PKS-Systeme, bei denen der peptidische Anteil nichtribosomal synthetisiert wird (Abb. 2.2).

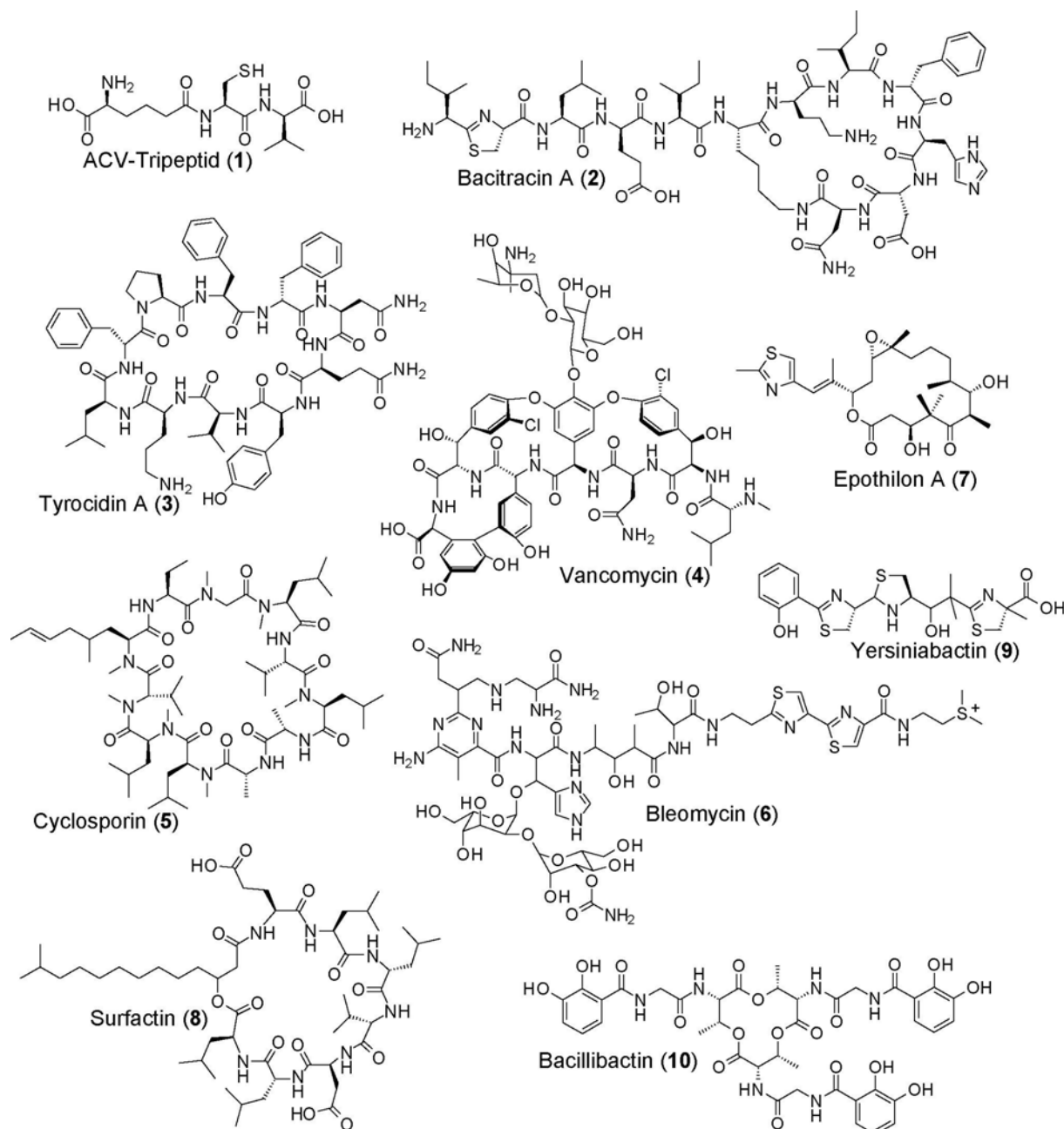


Abb. 2.2: Nichtribosomal synthetisierte Naturstoffe: Dargestellt sind δ -(α -Amino adipyl)-L-Cysteiny-D-Valin (ACV) (**1**) (*Penicillium chrysogenum*), Bacitracin A (**2**) (*Bacillus licheniformis*), Tyrocidin A (**3**) (*Bacillus brevis*), Vancomycin (**4**) (*Amycolatopsis orientalis*), Cyclosporin A (**5**) (*Tolypocladium niveum*), Bleomycin (**6**) (*Streptomyces verticulus*), Epothilon A (**7**) (*Sorangium cellulosum*), Surfactin (**8**) (*Bacillus subtilis*), Yersiniabactin (**9**) (*Yersinia pestis*) und Bacillibactin (**10**) (*Bacillus subtilis*).

2.3 Die nichtribosomalen Peptidsynthetasen

Peptidsynthetasen sind modular aufgebaute Multienzyme. Jedes Modul ist für die spezifische Erkennung, Aktivierung und Einbau eines Synthesebausteins (in der Regel einer Aminosäure) in die wachsende Peptidkette verantwortlich. Aufgrund des Kolinearitätsprinzips entspricht die Anzahl und Position der Module im allgemeinen der Anzahl und der Position der eingebauten Aminosäuren im Produkt [Mootz et al., 2002]. Es sind jedoch auch Peptidsynthetasen bekannt, die nicht diesem Prinzip entsprechen und einen iterativen Mechanismus verwenden, z.B. Bacillibactin (**10**) [May et al., 2001]. Auch in vielen nichtlinearen Systemen, wie z.B. dem Bleomycin (**6**) und dem Yersiniabactin (**9**) findet man Abweichungen vom Kolinearitätsprinzip.

In pilzlichen Systemen sind die Module eines NRP-Montagebandes in der Regel auf einer einzigen Polypeptidkette lokalisiert. So besteht beispielsweise die für die Cyclosporin A (**5**) Synthese verantwortliche Peptidsynthetase CsaA aus 13 Modulen, besitzt ein Molekulargewicht von 1,6 MDa und wird von einem einzigen Strukturgen mit einer Größe von ca. 46 kb kodiert. In bakteriellen NRP-Biosynthesystemen sind die einzelnen Module dagegen auf mehrere, zumeist kleinere multimodulare NRPSs verteilt, die sich zu einem NRP-Biosynthese-Komplex zusammenlagern. Die kodierenden NRPS-Gene sind zum Zwecke einer gemeinsamen transkriptionellen Kontrolle gewöhnlich in einem Operon organisiert.

2.3.1 Die Domänenorganisation in nichtribosomalen Peptidsynthetasen

Ein Modul ist für die Erkennung, Aktivierung, ggf. Modifikation und den Einbau eines spezifischen Bausteins in das wachsende Peptidprodukt verantwortlich. Diese unterschiedlichen Aufgaben werden von distinkten katalytischen Domänen übernommen. Je nach katalysierter Reaktion wird zwischen essentiellen bzw. Core-Domänen und optionalen bzw. modifizierenden Domänen unterschieden.

Die drei sogenannten Core-Domänen A (Adenylierungsdomäne), PCP (Peptidyl-Carrier-Protein, früher Thiolierungs(T)domäne) und C (Kondensationsdomäne, engl. *condensation domain*) bilden die kleinste modulare Einheit, ein sogenanntes Minimalmodul, welches für die Erkennung, Aktivierung und den Einbau eines Synthesebausteins in die wachsende Peptidkette verantwortlich ist. Man bezeichnet es daher auch als Elongationsmodul.

Der Adenylierungsdomäne (A-Domäne) kommt dabei die Aufgabe zu, als erstes und wichtigstes Kontrollelement spezifisch die Substrataminosäure (allgemein das Substrat) zu erkennen und diese in einer ATP-abhängigen Reaktion als Aminoacyladenylat zu aktivieren (Abb. 2.3) [Stachelhaus und Marahiel, 1995]. Die spezifische Erkennung des Substrates erfolgt dabei in der Bindungstasche der A-Domäne [Stachelhaus et al., 1999; May et al., 2001].

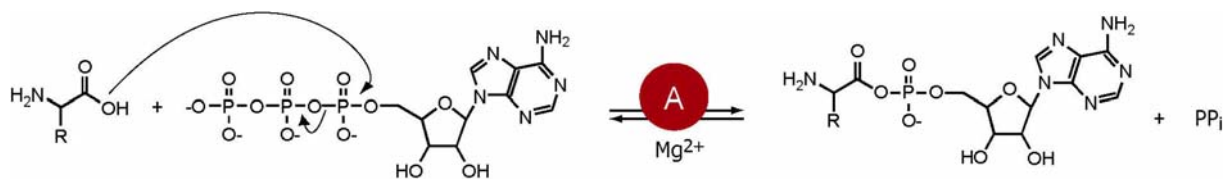


Abb. 2.3: Substraterkennung und -aktivierung: Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne) erkennt und aktiviert die Substrataminosäure als Aminoacyladenylat. Die Reaktion erfolgt in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen und unter Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat.

Die aktivierte Aminosäure wird anschließend als Thioester am Kofaktor 4'-Phosphopantethein (Ppant) des Peptidyl-Carrier-Proteins (PCPs) kovalent gebunden und kann anschließend, wie auch weitere Reaktionsintermediate, von einem Reaktionszentrum zum nächsten weiter gereicht werden, um somit die gerichtete Synthese des Endproduktes zu erzielen [Stein et al., 1994, Stein et al., 1996]. Um die kovalente Bindung der Substrataminosäure zu ermöglichen bedarf es zuvor der posttranslationalen Modifikation der inhärenten Peptidyl-Carrier-Protein-(PCP)-Domänen und ihrer Umwandlung von der inaktiven apo- zur aktiven, phosphopantetheinylierten holo-Form (Abb. 2.4). Diese als *priming* bezeichnete Reaktion erfolgt durch spezialisierte Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen), die den nukleophilen Angriff der Hydroxyl-Gruppe eines konservierten Serin-Restes der PCP-Domäne auf die β -3'-Phosphatgruppe des Ko-Substrates Coenzym A (CoASH) katalysieren [Mofid et al., 2002; Lambalot et al., 1996].

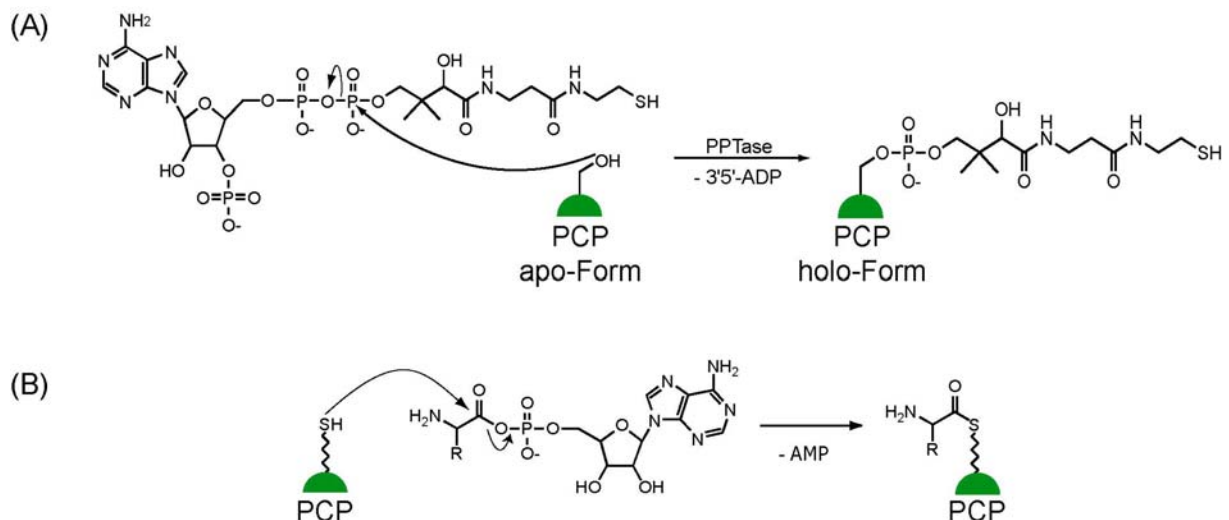


Abb. 2.4: Reaktionen der PCP-Domäne. (A) Posttranslationale Modifizierung der PCP-Domäne (Priming-Reaktion). PPTasen katalysieren die Umwandlung von inaktiven apo-PCP-Domänen in ihre aktive holo-Form. Dabei wird die 4'-Phosphopantethein-Einheit von CoASH auf einen invarianten Serinrest des jeweiligen PCPs übertragen. **(B) Beladung der PCP-Domäne.** Die aktivierte Aminosäure wird unter Abspaltung von AMP kovalent als Thioester auf dem 4'-PP-Kofaktor gebunden.

Die Kondensationsdomäne (C-Domäne) ist für die Knüpfung einer Peptidbindung und damit für die Verlängerung der naszierenden Peptidkette um eine (Amino-)Acyleinheit verantwortlich (Abb. 2.5) [Bergendahl et al., 2002; Stachelhaus et al., 1998]. Ihre pseudodimere Organisation spiegelt sich in der Bildung von zwei aktiven Untereinheiten wider [Keating et al., 2002]. Die Donor-(D)-Seite ist für die Bindung des Elektrophils (die Aminoacyl- oder Peptidyleinheit des vorangehenden Moduls) zuständig und differenziert selektiv zwischen Enantiomeren (D/L-Spezifität). In der Akzeptor-(A)-Seite wird das Nukleophil (die Aminosäure des eigenen Moduls) koordiniert. Neben der Stereospezifität der Aminosäure werden in dieser Position auch selektiv Veränderungen in der Seitenkette erkannt [Belshaw et al., 1998; Ehmann et al., 2000]. Sind sowohl in der Donor- als auch der Akzeptorseite der C-Domäne Aminosäuren koordiniert, die hinsichtlich Stereoselektivität und Seitenkettenspezifität die Kriterien der C-Domäne erfüllen, so erfolgt die Kettenverlängerung durch nucleophilen Angriff der α -Aminogruppe der PCP-gebundenen Aminosäure auf das stromaufwärts liegende Carbonyl-C-Atom des als Thioester gebundenen Aminosäure- oder Peptidylrestes. Anschließend wird das um eine Aminosäureeinheit verlängerte Peptidyl-S-Ppant Intermediat zum nächsten Modul weitergeleitet.

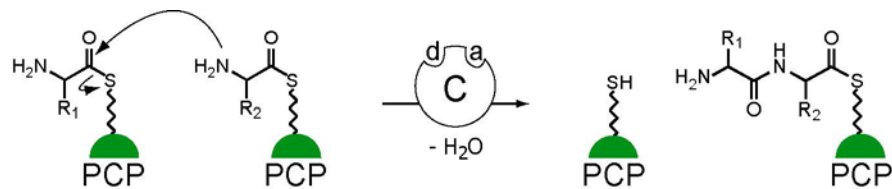


Abb. 2.5: Die Kondensationsreaktion. Katalysiert durch die C-Domäne erfolgt die Peptidbindungsknüpfung. Die Kettenverlängerung erfolgt durch einen nukleophilen Angriff der in der Akzeptor-Position koordinierten Aminoacyl-S-Ppant Einheit auf den in der Donor-Position koordinierten Aminoacyl- oder Peptidyl-S-Ppant-Rest.

Die Wiederholung von Substraterkennung und -aktivierung, sowie Peptidbindungsknüpfung und Translokation des gebildeten Peptides von Modul zu Modul, führt zur gerichteten Synthese des vollständigen Produktes, welches als Peptidyl-Thioester auf dem Ppant-Kofaktor der letzten PCP-Domäne des Proteintemplates gebunden ist. Die Freisetzung des Peptides erfolgt unter der katalytischen Kontrolle der C-terminalen, internen Thioesterase-(Te)-Domäne (Abb. 2.6). Dabei wird zunächst das lineare Peptidyl-Intermediat vom Kofaktor Ppant auf die Seitenkette eines hochkonservierten Serin-Restes der Te-Domäne [Shaw-Reid et al., 1999] übertragen. Dieser, in der CoreT-Sequenz GxSxG lokalisierte Rest, ist integraler Bestandteil der aus Serin-Proteasen und Thioesterasen bekannten katalytischen Triade Asp-His-Ser [Li et al., 1996; Pazirandeh et al., 1991; Tai et al., 1993]. Je nach Art des Nukleophils und der Substrat-Spezifität der Te-Domäne werden bei der anschließenden Spaltung des Peptidyl-O-Ser-Esters lineare, zyklische, zyklisch-verzweigte oder multimere Peptide erhalten.

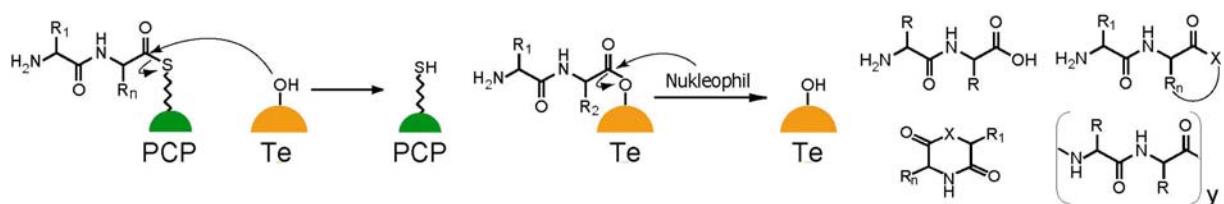


Abb. 2.6: Produktfreisetzung. Die Termination der Peptidsynthese wird durch die Te-Domäne katalysiert. Dabei entstehen je nach verwendetem Nukleophil lineare, zyklische, zyklisch-verzweigte oder multimere Peptide.

Einige pilzliche Systeme, wie z.B. Cyclosporin nutzen eine alternative Methode zur Produktabspaltung. Die C-terminale C-Domäne übernimmt dabei die Aufgabe einer Te-Domäne, wobei unter Makrozyklisierung eine Peptidbindung geknüpft und das Produkt freigesetzt wird [Weber et al., 1994].

Eine weitere Möglichkeit ist die Freisetzung linearer Peptide unter Katalyse einer externen Reduktase-(R)-domäne. Dabei wird NADPH-abhängig das Produkt durch Reduktion der C-terminalen α -Carboxylgruppe zum entsprechenden Aldehyd oder Aminoalkohol freigesetzt (Abb. 2.7) [Kessler et al., 2004; Gaitatzis et al., 2001, Silakowski et al., 2000].

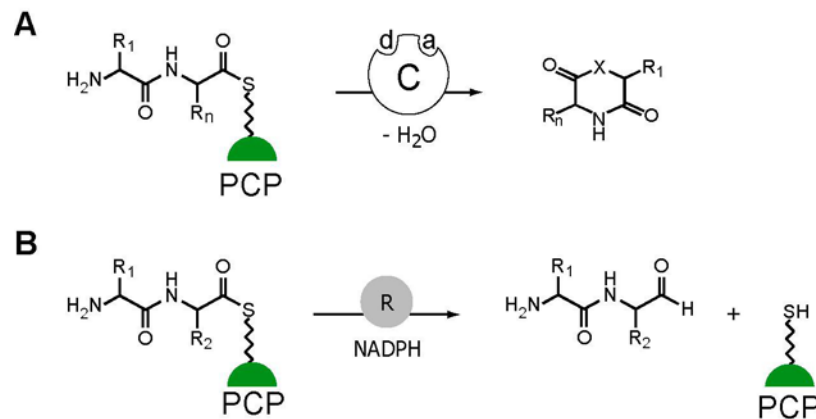
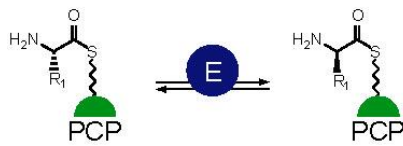


Abb. 2.7: Alternative Produktfreisetzung. (A) Spezielle C-Domänen katalysieren die Produktfreisetzung unter Bildung eines Makrozyklus. (B) R-Domänen katalysieren die Produktfreisetzung unter Bildung linearer Aldehyde.

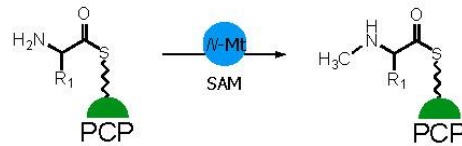
Neben den Core-Domänen existieren optionale Domänen, die das Primärprodukt modifizieren und damit maßgeblich zur Strukturvielfalt nichtribosomal synthetisierter Naturstoffe beitragen. Zu ihnen zählen die Epimerisierungsdomäne (E-Domäne), die N-Methylierungs- (N-Mt-Domäne) und die Formylierungsdomäne (F-Domäne), sowie Heterozyklisierungs- (Zy-Domäne), Oxidations- (Ox-Domäne) und Reduktasedomäne (Red-Domäne) (Abb. 2.8).

E-Domänen sind häufiger Bestandteil nichtribosomaler Peptidsynthetasen. Sie sind C-terminal des PCPs des dazugehörigen Moduls lokalisiert und katalysieren die Racemisierung der PCP-gebundenen Aminosäure [Stachelhaus und Walsh 2000] bzw. der S1-Position eines naszierenden Peptidyl-S-Ppant [Linne et al., 2001]. E-Domänen stellen neben D-Aminosäure aktivierenden A-Domänen die einzige Möglichkeit zum Einbau dieser Enantiomere dar. Im Anschluss an die E-Domänen finden sich stromabwärts C-Domänen, die eine entsprechende Selektivität für D-konfigurierte Aminosäuren besitzen. Gemeinsam stellen sie den Einbau des D-Enantiomers in die wachsende Peptidkette sicher [Belshaw et al., 1999, Linne et al., 2001].

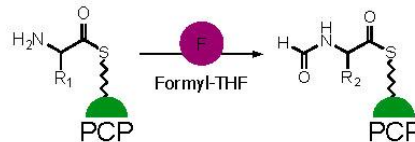
(A) E-Domäne



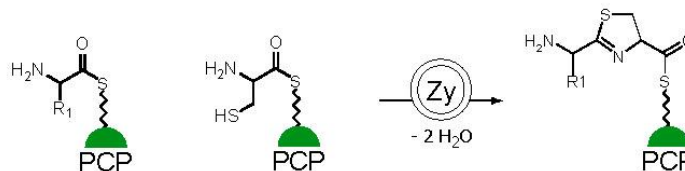
(B) N-Mt-Domäne



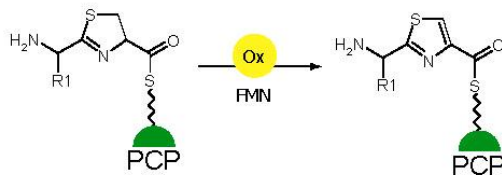
(C) F-Domäne



(D) Zy-Domäne



(E) Ox-Domäne



(F) Red-Domäne

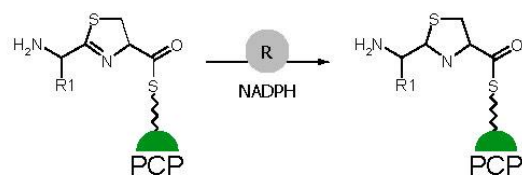


Abb. 2.8: Reaktionen optionaler Domänen. (A) **Reaktion der E-Domäne.** Die E-Domäne katalysiert - je nach Lokalisation innerhalb eines NRPSs - die Racemisierung des α -C-Atoms eines Aminoacyl-S-PP bzw. die S1-Position eines naszierenden Peptidyl-S-PP. (B) **Reaktion der N-Mt-Domäne.** Methylierungsdomänen katalysieren S-Adenosylmethionin(SAM)-abhängig N-Methylierungen. (C) **Reaktion der F-Domäne.** Die Formylierungsdomäne katalysiert unter Verwendung von Formyl-Tetrahydrofolat (THF) die Formylierung des N-Terminus der Peptidkette. (D) **Heterozyklisierung.** Die Heterozyklisierungs-(Zy-)domäne katalysiert in einem dreistufigen Reaktionsverlauf die Bildung von Thiazolin- bzw. Oxazolin-basierten Heterozyklen. (E) **Reaktion der Ox-Domäne.** Die Oxidationsdomäne oxidiert in einer Flavin-Mononukleotid(FMN)-abhängigen Reaktion die Thiazolin- bzw. Oxazolin-Heterozyklen zu den entsprechenden Thiazol- bzw. Oxazol-Heteroaromaten. (F) **Reaktionen der Red-Domäne.** Reduktasedomänen sind NADPH-abhängige Enzyme, die an zwei verschiedenen Lokalisationen innerhalb einer NRPS auftreten können. In Verbindung mit Cy-Domänen katalysieren sie die Bildung von Thiazolidin- bzw. Oxazolidin-Heterozyklen. Am C-Terminus eines molekularen Fließbandes stellen sie hingegen eine Alternative zu Te-Domänen bei der Termination dar und katalysieren die reduktive Produktfreisetzung.

Einige nichtribosomal synthetisierte Peptide, z.B. Cyclosporin A (**5**), besitzen N-methylierte Aminosäuren. Die Methylierung der Aminogruppe enzymgebundener Aminoacyl bzw. Peptidyl-S-PP-Intermediate erfolgt in einer S-Adenosylmethionin-(SAM)-abhängigen Reaktion unter Katalyse von N-Methylierungsdomänen [Haese et al., 1993; Pieper et al., 1995; Schauwecker et al., 2000; Miller et al., 2001].

Weiterhin kann die Peptidkette am N-Terminus formyliert werden. Dies erfolgt in Gegenwart von Formyltransferasen sowie des Kofaktors N-Formyltetrahydrofolat. Beispiele hierfür sind die Biosynthesesysteme des Anabaenopeptilids 90-A sowie des linearen Gramicidins [Rouhiainen et al., 2000; Kessler et al., 2004].

Eine besondere Modifizierung des Peptidrückgrates stellt die Bildung fünfgliedriger, heterozyklischer Ringe dar. Diese Modifikation erfolgt während der Peptidbindungsknüpfung durch den nukleophilen Angriff einer Serin-, Threonin- oder Cystein-Seitenkette auf das α -Carbonyl-C-Atom der vorausgegangenen Aminosäure. Katalysiert wird die Ringbildung der Oxazoline bzw. Thiazoline durch spezielle Heterozyklisierungsdomänen, welche die C-Domäne des korrespondierenden Elongationsmoduls ersetzen und gleichzeitig deren Funktion übernehmen. [Dürfahrt et al., 2004, Konz et al., 1997]. Die gebildeten Heterozyklen können durch optionale Oxidations- bzw. Reduktasedomänen weiter modifiziert werden. Oxidationsdomänen sind entweder in die jeweilige Adenylierungsdomäne inseriert oder schließen sich an dieses Modul an. In einer Flavin-Mononucleotid-(FMN)-abhängigen Reaktion ermöglichen sie die Bildung der entsprechenden Oxazol- bzw. Thiazol-Derivate [Schneider et al., 2003]. Reduktasedomänen hingegen sind freistehende NADPH-abhängige Enzyme, welche die Bildung von Oxazolidin- bzw. Thiazolidin-Heterozyklen [Reimann et al., 2001] katalysieren.

Die Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese erfolgt in der Regel durch ein Initiationsmodul mit der Domänenorganisation A-PCP oder A-PCP-E durch die Aktivierung des ersten Substrats [Keating und Walsh, 1999], wobei die als 4'-Ppant-Thioester-gebundene Aminosäure den ersten Donor (Elektrophil) für die Peptidknüpfung liefert. Daraufhin erfolgt die Übertragung auf die C-Domäne des ersten Elongationsmoduls. Die Entdeckung der C-Domänenspezifität führte dazu, Elongationsmodule als Einheiten mit der Domänenfolge C-A-PCP zu betrachten [Mootz et al., 2000]. Die weiteren Syntheseschritte an den beschriebenen Elongationsmodulen erfolgen nach dem *multiple-carrier-thiotemplate*-Modell [Stein et al. 1996]. Das letzte Modul der Biosynthese ist ein um eine Te-Domäne erweitertes

Elongationsmodul. Die Te-Domäne überträgt das lineare Peptidylintermediat auf einen invarianten Serinrest, von dem es unter Einwirkung eines Nukleophils abgespalten wird (Abb. 2.9).

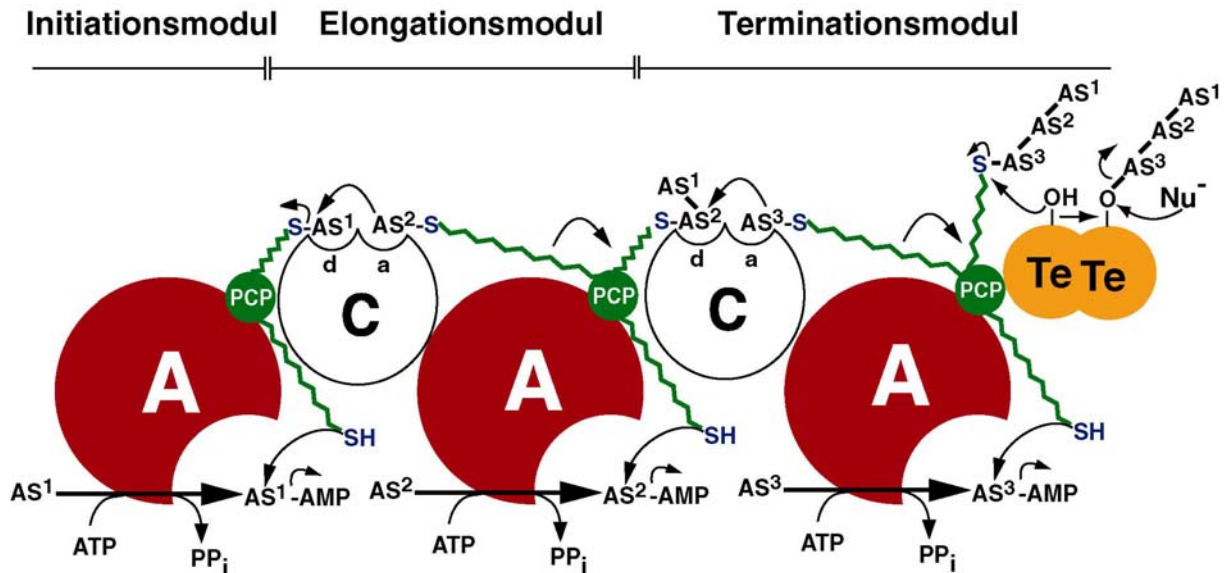


Abb. 2.9: Gerichtete Peptidbiosynthese. Das Initiationsmodul (Domänenorganisation A-PCP) aktiviert und transferiert das erste Substrat zur Donorstelle (d) der C-Domäne des Elongationsmoduls (C-A-PCP). Die in der Akzeptorseite (a) der C-Domäne wartende Aminosäure greift das Aminoacyl-S-PP nukleophil an, wodurch es zur Peptidknüpfung und im weiteren Verlauf zur Translokation des gebildeten Peptidyl-S-PP-Intermediates auf die Donorstelle der C-Domäne des nächsten Elongationsmoduls kommt. Daraufhin wiederholt sich der Vorgang und die Peptidkette wächst kontinuierlich, bis das letzte Modul, das Terminationsmodul (C-A-PCP-Te), erreicht ist. Das lineare Peptidylintermediat wird auf einen invarianten Serinrest der Te-Domäne übertragen, von dem es unter Einwirkung eines Nukleophils abgespalten wird.

2.4 Das Peptidantibiotikum Tyrocidin A

Am Beispiel der Biosynthese des Peptidantibiotikums Tyrocidin werden Prinzip und Organisation der NRPS im Folgenden etwas genauer betrachtet. Tyrocidin wurde erstmals 1941 von Hotchkiss und Dubos [Hotchkiss und Dubos, 1941] aus Kulturüberständen von *Bacillus brevis* extrahiert. Tyrocidin besteht aus einem Gemisch zyklischer Dekapeptide, den Tyrocidinen A, B, C und D, die alle praktisch identische biologische Aktivitäten aufweisen [Fujikawa et al., 1968a]. Das im weiteren Verlauf beschriebene Tyrocidin A besitzt die Aminosäureabfolge (-DPhe-Pro-Phe-DPhe-Asn-Gln-Tyr-Val-Orn-Leu-)zykl (Abb. 2.10). Die anderen Tyrocidine B, C und D unterscheiden sich durch den schrittweisen Austausch der aromatischen

Aminosäuren an den Positionen 3, 4 und 7 gegen Tryptophan [Ruttenberg & Mach, 1966].

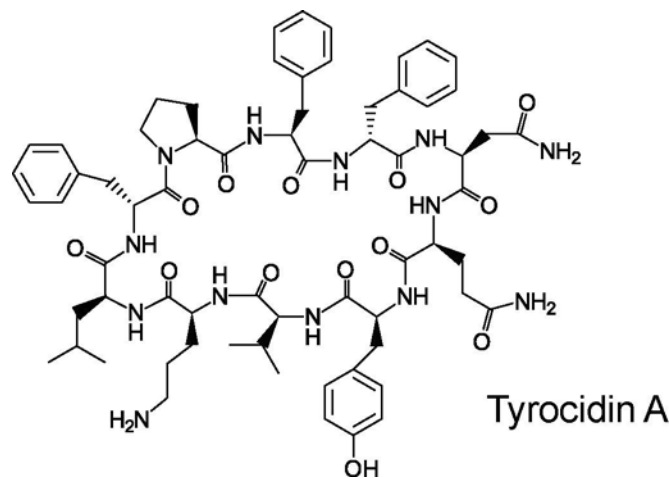


Abb. 2.10: Das Peptidantibiotikum Tyrocidin A

Tyrocidin besitzt bakterizide Wirkung insbesondere gegen viele Gram-positive, und in abgeschwächter Form auch gegenüber Gram-negativen Bakterien [Hunter und Schwartz, 1967; Mootz und Marahiel, 1999]. Ursache dafür ist offenbar ein pleiotroper Effekt auf die Membranhülle der angegriffenen Zellen. Infolge seiner tensidischen Eigenschaften zerstört es die Integrität der Membran und löst somit den Zelltod durch Lyse und dem damit verbundenen Verlust von kleinen intrazellulären Molekülen wie Aminosäuren, Pyrimidin- und Purinbasen aus. Aufgrund seiner hämolytischen Aktivität (der Lyse von Erythrozyten) wird es nicht systemisch, sondern nur als oberflächliches Antibiotikum in Hautsalben angewendet. Dort wird es in Kombination mit linearem Gramicidin eingesetzt. Das als Tyrothricin bezeichnete Gemisch beider Peptidantibiotika wird von den *B. brevis* Stämmen ATCC 8185 und ATCC 10068 produziert.

In den 70er und 80er Jahren wurde in zahlreichen Studien versucht, für Tyrocidin eine regulatorische Funktion, etwa in der Sporulation, nachzuweisen [Ristow et al., 1979]. Daneben wurde berichtet, daß Tyrocidin *in vitro* an DNA bindet [Schatzschneider et al., 1974] und die aus exponentiell wachsenden *B. brevis* Zellen isolierte RNA-Polymerase inhibiert [Ristow et al., 1982]. Eine eindeutige biologische Funktion, die über den Einsatz als Verteidigungsmittel hinausgeht, konnte bislang nicht zugeordnet werden [Katz und Demain, 1977; Mootz und Marahiel, 1999b].

2.4.1 Die Biosynthese des Peptidantibiotikums Tyrocidin A

Tyrocidin A wird durch die drei Synthetasen TycA, TycB und TycC, deren kodierenden Gene *tycA*, *tycB* und *tycC* in einem Operon organisiert sind, gebildet (Abb. 2.11). Die Tyrocidin-Synthetasen TycA, TycB und TycC bestehen aus einem, drei bzw. sechs Modulen, die sich zu einem Multienzym-Komplex zusammenlagern [Fujikawa et al., 1968b; Fujikawa et al., 1971; Kambe et al., 1971; Roskoski et al., 1970a; Lee und Lipmann, 1975, Mootz und Marahiel, 1997]. Das Initiationsmodul TycA (Domänenorganisation A-PCP-E) aktiviert und epimerisiert die Substrataminosäure Phe und überträgt das gebildete D-Phe auf das durch TycB1 aktivierte L-Pro. Das trimodulare TycB verlängert die Peptidkette bis zum Tetrapeptid der Aminosäureabfolge D-Phe-Pro-Phe-D-Phe und reicht dieses dann an TycC weiter, das die restlichen sechs Aminosäuren Asn, Gln, Tyr, Val, Orn und Leu inkorporiert und schließlich das zyklische Produkt abspaltet.

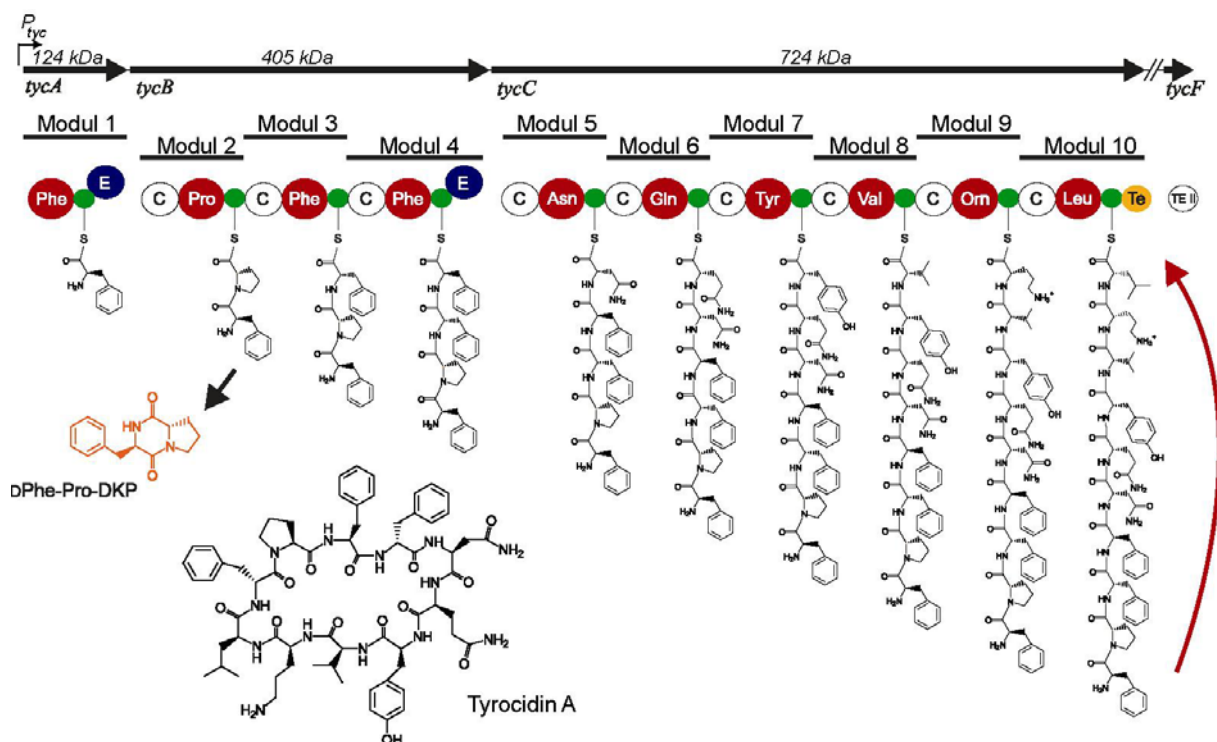


Abb. 2.11: Biosynthesesystem von Tyrocidin A. Die in einem Gencluster organisierten polycistronischen Gene *tycA*, *tycB* und *tycC* kodieren für drei NRPSs TycA (124 kDa), TycB (405 kDa) und TycC (724 kDa), die das Biosynthesesystem des zyklischen Dekapeptids Tyrocidin A bilden. Die NRPSs bestehen jeweils aus einem, drei bzw. sechs Modulen, die jeweils für den Einbau einer Aminosäure in die wachsende Peptidkette verantwortlich sind. Zwei E-Domänen in Modul 1 und Modul 4 sorgen für den Einbau der D-Aminosäure D-Phe. Die Produktfreisetzung wird durch die interne Te-Domäne katalysiert.

Alle Intermediate bis zum linearen Dekapeptid konnten als enzymgebundene Thioester nachgewiesen werden [Roskowski et al., 1970]. Ebenso gelang es unter Zuhilfenahme traditioneller Methoden der Festphasensynthese [Merryfield et al., 1967], die lineare Peptidkette des Tyrocidin A chemisch-synthetisch aufzubauen und über einen biomimetischen Linker zu aktivieren und zu immobilisieren. Durch Zugabe der rekombinant hergestellten Thioesterase-Domäne (Te-Domäne) von TycC gelang die Abspaltung des gewünschten Produktes [Kohli et al., 2001]. Dieser Ansatz konnte auch zur Generierung einer kleinen Bibliothek an Tyrocidin-Derivaten verwendet werden.

2.5 Kommunikation in nichtribosomalen Peptidsynthetasen

Das intramolekulare Zusammenspiel der einzelnen Domänen in nichtribosomalen Peptidsynthetasen ist mittlerweile recht gut verstanden. Dazu haben sowohl biochemische als auch strukturelle Untersuchungen in den letzten Jahren maßgeblich beigetragen [Schwarzer et al., 2004]. Größter Verdienst der Strukturaufklärung der wichtigsten Domänen A, PCP, C und Te war neben der Interpretationshilfe hinsichtlich des Reaktionsmechanismus und der Identifikation des Katalysezentrums vor allen Dingen die Festlegung der Domänengrenzen [Conti et al., 1996, Weber et al., 2000; Keating et al., 2002; Bruner et al., 2001]. Diese sogenannten intramolekularen Linker-Regionen sind besonders reich an kleinen, hydrophilen Aminosäuren und besitzen aufgrund von Analysen keine ausgeprägten Sekundärstruktur-Merkmale oder Konservierungen. Bei der Generierung von Modulfusionen innerhalb dieser intramolekularen Linker-Regionen kann davon ausgegangen werden, dass die Produktbildung nicht durch Störungen in der Tertiär-Struktur der einzelnen Domänen beeinflusst wird [Dieckmann et al., 1999, Doekel et al., 2000, Mootz et al., 2000].

Grundsätzlich stehen für die Domänen- und Modulfusion mehrere Optionen zur Verfügung [Mootz und Marahiel, 1999], deren Praktikabilität zumeist an di- oder trimodularen Systemen nachgewiesen wurde [Doekel und Marahiel, 2000; Doekel et al., 2000, Mootz et al., 2000]. Im Gegensatz zu Fusionen innerhalb des intramolekularen Linkerbereiches ergaben Fusionen, die innerhalb konservierter Motive von Domänen durchgeführt wurden, häufig inaktive Enzyme [Elsner et al.,

1997; Symmank et al., 1999]. Als Quintessenz dieser Untersuchungen und unter Berücksichtigung der Selektivität der C-Domäne hinsichtlich der Akzeptorposition wurden Module als Einheiten von C-, A- und PCP-Domänen definiert [Mootz et al., 2000].

Darüber hinaus stehen auch optionale Domänen für die Konstruktion hybrider Peptidsynthetasen zur Verfügung. Untersuchungen im Zusammenhang mit E-Domänen zeigten, dass die benachbarten PCPs Unterschiede in der Primärstruktur aufweisen, je nachdem ob sie C-Terminal mit einer C-Domäne oder einer E-Domäne verknüpft sind [Linne et al., 2001]. Hinzu kommt die Enantioselektivität der C-Domäne, die bei entsprechenden Fusionen ebenfalls berücksichtigt werden muss.

In allen diesen Fällen wurde durch die Fusionierung eine kovalente Bindung der Domänen bzw. Module herbeigeführt. Eine sogenannte *cis*-Orientierung der Module hat den Vorteil, dass sich die einzelnen Reaktionszentren in räumlicher Nachbarschaft zueinander befinden, was die effektive Erkennung und Kommunikation erleichtert.

Viele nichtribosomal synthetisierte Naturstoffe werden aber durch das Zusammenspiel mehrerer Peptidsynthetasen gebildet, die sich frei in der Zelle bewegend selektiv finden müssen (*in trans*-Orientierung). Bisher konnte nicht geklärt werden, welche Faktoren den produktiven, intermolekularen Transfer des naszierenden Peptidproduktes zwischen NRPSs eines Multienzym-Komplexes vermitteln. Untersuchungen im Tyrocidin-System zeigten jedoch, dass die am Übergang der Synthetasen TycA, TycB und TycC vorkommenden Module selektiv nur ihren natürlichen Partner erkennen, d.h. TycA erkennt TycB1 und TycB3 erkennt TycC1. Eine Interaktion zwischen TycA und TycC1 bzw. TycB3 und TycB1 findet dagegen nur statt, wenn die entsprechenden Module fusioniert und damit künstlich in eine räumliche Nähe gebracht werden [Linne et al., 2003]. Wie steuern Multienzymkomplexe nun die selektive intramolekulare Kommunikation und warum werden Multienzymkomplexe überhaupt verwendet, eine Frage, die in den nächsten Kapiteln etwas genauer betrachtet werden soll.

2.6 Warum Multienzymkomplexe?

Das Prinzip der Assoziierung mehrerer, an aufeinanderfolgenden Schritten im Metabolismus der Zelle beteiligter Enzyme zu einem Multienzymkomplex, ist ein in der Natur weitverbreitetes Konzept [Srivastava und Bernhard, 1986]. Nahezu alle Organismen nutzen dieses Prinzip, das einen wichtigen Schritt bei der Verbesserung der katalytischen Effizienz darstellt. Die daraus resultierenden Vorteile sind bemerkenswert.

Normalerweise sind enzymatische Umsetzungen durch Diffusionsvorgänge limitiert, d.h. durch die Häufigkeit, mit der Enzyme auf ihre Substrate treffen. In Multienzymkomplexen wird die Distanz, die ein Reaktionsprodukt (das Substrat der nachfolgenden Reaktion) zurücklegen muss, minimiert. Im optimalen Fall entfällt dabei die Hydratisierung des Produktes und/oder das Abstreifen der Hydrathülle vor der nächsten chemischen Umwandlung. Gleichzeitig vermindert dieses Prinzip die Gefahr, dass Reaktionsintermediate und Metabolite in unerwünschten Nebenreaktionen abgebaut oder umgesetzt werden.

Die Strukturgene der in Multienzymkomplexen zusammenwirkenden Enzyme sind in Prokaryoten häufig in Operons organisiert. Die gemeinsame transkriptionelle Regulation und Bildung einer gemeinsamen polycistronischen mRNA bieten den Vorteil, dass alle beteiligten Enzyme zum gleichen Zeitpunkt und in stöchiometrischen Mengen produziert werden. Eukaryoten sind hingegen auf Regulatorproteine angewiesen, die unterschiedliche Fähigkeiten hinsichtlich der molekularen Erkennung aufweisen.

2.7 Kommunikation und Interaktion in Multienzymkomplexen

Komplexe Reaktionsabfolgen durch Multienzymkomplexe katalysieren zu lassen, ist in der Natur ein häufig anzutreffendes Prinzip. Dies wirft aber gleichzeitig die Fragen auf, wie sich Reaktionspartner erkennen, welche strukturellen oder funktionellen Voraussetzungen eine effektive Interaktion ermöglichen und wie die einzelnen Reaktionsschritte reguliert werden.

Es sind in der Regel die Untereinheiten der Komplexe, die Domänen, die für die Interaktionen verantwortlich sind. Sie sind in der Lage, Proteine spezifisch an bestimmte Positionen innerhalb der Zelle zu transportieren und ermöglichen die Erkennung posttranslational modifizierter Proteine oder anderer Botenstoffe (*second messenger*). Darüber hinaus kontrollieren sie Konformation, Aktivität und Substratspezifität der Enzyme.

In der Signaltransduktion z.B. katalysieren Tyrosinkinasen die Phosphorylierung spezifischer Tyr-Reste, die dann von Phosphotyrosin-(pTyr)-Erkennungsdomänen (z.B. Src Homology 2 (SH2) oder pTyr-bindende Domänen (PTB)) erkannt werden [Yaffe, 2002]. Domänen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, lassen sich anhand von konservierten Aminosäuresequenzen identifizieren. Basierend auf der Zusammensetzung der Domäne können Rückschlüsse und Voraussagen bezüglich der Bindungseigenschaften und der biologischen Funktion getroffen werden. Oftmals ist die Affinität einer einzelnen Domäne zu einem Aminosäuremotiv ausreichend, eine spezifische Interaktion in der Zelle auszulösen [Copley et al., 2002]. Bemerkenswert ist auch die Wandlungsfähigkeit vieler solcher Domänen, die es ihnen ermöglicht, mehrere Liganden entweder gleichzeitig oder nacheinander zu bedienen und zu akzeptieren [Tsukazaki et al., 1998], wobei verschiedene Vertreter des gleichen Domärentyps ganz unterschiedliche Bindungsmotive erkennen [Donaldson et al., 2002]. Durch Wiederholungen ein und desselben Motivs können ganze Erkennungsflächen an der Oberseite der Domänen geschaffen werden, die vielfältige Bindungsmöglichkeiten eröffnen [Groves und Barford, 1999]. Häufig wird die Bindungsstelle der Domänen erst durch posttranslationale Modifikationen fertiggestellt. Dies erfordert seitens der Domäne ein hohes Maß an Ausgewogenheit zwischen Induzierbarkeit und Spezifität, da ein Großteil der Bindungsenergie auf die Bindung des modifizierten Restes zurückzuführen ist [Kuriyan & Cowburn, 1997].

Auch wenn die Reaktionen oder Aufgaben, die von Multienzymkomplexen katalysiert bzw. übernommen werden sehr unterschiedlich sind, so sind es doch allgemeingültige Prinzipien, durch die funktionale Komplexe aufgebaut, einzelne molekulare Komponenten aufgeteilt und Enzyme selektiv zu ihren Zielpunkten geführt werden können. Wie unterschiedlich diese Aufgaben sein können, soll im Folgenden an zwei Beispiele näher erläutert werden. Beispiel 1 sind die E3-Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Weges, die am Abbau von Proteinen beteiligt sind und

somit einem katabolen Weg zuzuschreiben sind. Im zweiten Beispiel werden die Interaktionen in modularen Polyketidsynthasen (PKS) näher beleuchtet, welche die Synthese von Polyketidantibiotika steuern und denen aufgrund ihrer Verwandtschaft zu NRPSs mein besonderes Interesse gilt.

2.7.1 Die Enzymklasse E3 der Ubiquitin Proteinligasen

Ein Paradebeispiel für unterschiedliche und zugleich spezifische Protein-Protein-Interaktion stellen die Ubiquitin Proteinligasen E3 des Ubiquitin-Proteasom-Weges dar. Sie spielen beim Abbau von Proteinen, die aufgrund regulatorischer oder qualitätssichernder Maßnahmen abgebaut und entfernt werden müssen, eine entscheidenden Rolle. Ihre Aufgabe ist es, im Zusammenspiel mit den Ubiquitin aktivierenden Enzymen E1 und den Ubiquitin konjugierenden Enzymen E2 aus der Vielzahl der angebotenen Proteinsubstrate selektiv jene auszuwählen, die es durch Ubiquinylierung zu markieren und somit für den Abbau durch das Proteasom vorzubereiten gilt (Abb. 2.12) [Ciechanover, 1998].

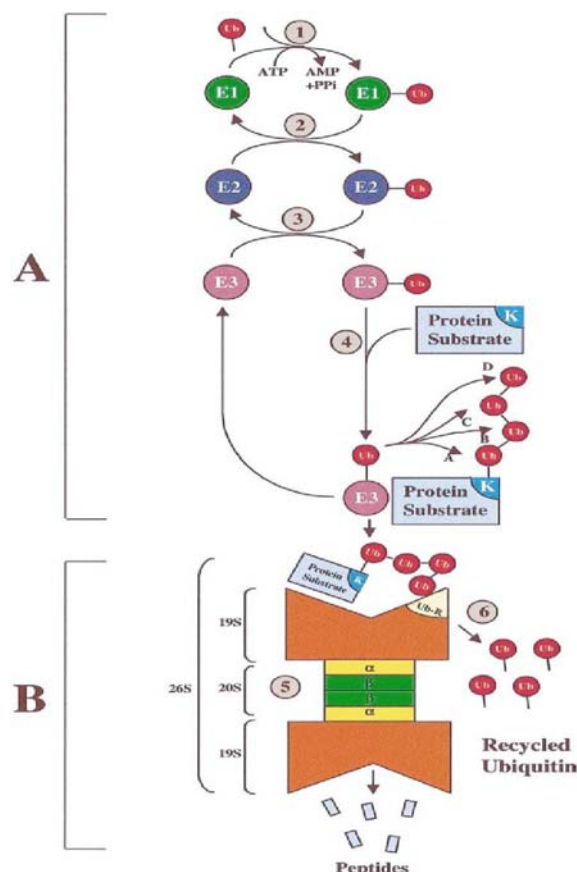


Abb. 2.12: Der Ubiquitin-Proteasom-Weg.

(A) Konjugation des Ubiquitins mit dem Zielmolekül (B) Abbau des ubiquitylierten Substrats durch das 26S-Proteasom.

(1) Aktivierung des Ubiquitins durch E1. (2) Transfer des aktivierten Ubiquitins von E1 auf einen Vertreter der E2-Enzymklasse. (3) Transfer von aktiviertem Ubiquitin von E2 auf ein Substrat-spezifisches Enzym der Familie E3. (4) Bildung eines Substrat-E3-Komplexes und Biosynthese eines am Substrat verankerten Polyubiquitinschwanzes. (5) Bindung des Polyubiquitinschwanzes an den Ubiquitin-Rezeptor-Untereinheit des 19S-Komplexes des 26S-Proteasoms und Abbau der Substrate in kurze Peptide durch den 20S-Komplex. (6) Rückgewinnung von Ubiquitin unter Mitwirkung von Isopeptidasen.

Die Erkennung von Ubiquitin konjugierenden E2-Enzymen erfolgt in Abhängigkeit des abzubauenen Substrates und durch spezifische Interaktion der ca. 150 Aminosäuren umfassenden Ubiquitin konjugierenden Domäne (UBC) mit spezialisierten Domänen der E3-Enzyme. UBCs variieren hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und steuern hierüber die spezifische Interaktion mit E3s.

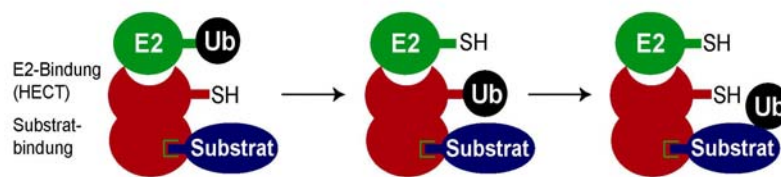
Die Einteilung von E3-Enzymen in verschiedene Klassen erfolgt anhand der für die Erkennung von E2-Enzymen verantwortlichen hochkonservierten Domänen. Die meisten dieser Enzyme lassen sich den beiden Hauptklassen, den HECT-Domänen E3s und den RING-Domänen (oder RING-Finger) E3s, zuordnen.

HECT-Domänen (Homologous to E6AP C-Terminus) sind ca. 350 Aminosäuren groß und invariabler Bestandteil des C-terminalen Bereiches der HECT Proteine. Im C-Terminus der HECT-Domäne findet sich ein konservierter Cysteinrest, welcher Ubiquitin über einen Thioester bindet und damit essentiell für die Übertragung des Ubiquitins von E2 auf E3 ist. Entscheidend für die Bindung von E2 und HECT E3-Domänen sind ausgeprägte Motivhomologien zwischen E2 und dem C-terminalen Bereich der HECT E3-Domäne. Der N-terminale Bereich von HECT-E3s ist für die Bindung des Substrates verantwortlich.

RING-Domänen bzw. RING-Finger (Really Interesting New Genes) sind mit 40-100 Aminosäuren deutlich kleiner als HECT-Domänen und auf Seiten der RING-Domänen E3s für die Interaktion mit E2-Enzymen verantwortlich. Definiert wird der RING-Finger durch insgesamt acht konservierte Aminosäurereste, sechs Cystein- und zwei Histidinreste, die zwei Zink-Ionen kreuzförmig koordinieren [Borden und Freemont, 1996]. Abwandlungen dieses Motivs findet man in den sogenannten PHD-Fingern (Plant Homeo-Domain) und der U-Box (Ubiquitylation box) [Capili et al., 2001; Hatakeyama et al., 2001].

Die Bindung der jeweiligen E2-Domäne und die des Substrates erfolgt an zwei verschiedenen Polypeptiden. Während die RING-Domäne für die Bindung von E2 verantwortlich ist, wird das Substrat an einer SCF-Domäne (SCF-Domäne = Skp/Cullin/E box gebunden) (Abb. 2.13).

A. HECT-Domänen E3s:



B. RING-Domänen E3s:

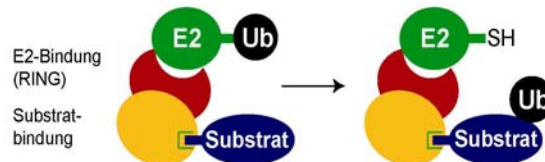


Abb. 2.13: Bindung von E2- Domänen durch HECT- bzw. RING-Domänen E3s. HECT-Domänen E3s (Homologous to E6AP C-Terminus) binden kognate E2s über die konservierte HECT-Domäne und übernehmen Ubiquitin auf einen konservierten Cysteinrest. In einem zweiten Schritt wird das Ubiquitin auf das am N-Terminus gebundene Substrat übertragen **(A)**. RING-Domänen E3s (Really Interesting New Genes) sind Gerüstproteine, die eine RING-Domäne zur Bindung der E2s und eine andere für die Substratbindung verwenden **(B)**.

Auch die Möglichkeiten der Substraterkennung sind vielfältig. Diese kann durch konstitutive Erkennung eines primären Sequenzmotivs (z.B. N-end rule) erfolgen, bei der entweder basische (Typ I) oder sperrige, hydrophobe N-terminale Reste (Typ II) von speziellen E3-Enzymen erkannt und in der Bindungstasche fixiert werden [Bachmair et al., 1986]. Dazu ist ein in der Literatur als Degron bezeichnetes Element erforderlich, das sowohl notwendig als auch ausreichend für die Interaktion zwischen Enzym und Substrat ist [Kwon et al., 2002]. Des Weiteren bietet die post-translationale Modifizierung der Substrate durch Phosphorylierung, Oxidation oder Acetylierung die Möglichkeit, selektive Protein-Protein-Interaktionen aufzubauen. So führt z.B. die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten in den Substraten zur Bindung an sogenannten F-Boxen in den SCF-Domänen der E3-Enzyme [Kipreos und Pagano, 2000]. Schließlich kann die Substratbindung auch unter Zuhilfenahme von Hilfsenzymen erfolgen. Bei diesem Mechanismus erfolgt zuerst die Interaktion zwischen Proteinsubstrat und Hilfsenzym und anschließend die Interaktion zwischen dem assoziierten Komplex und dem E3-Enzym [Scheffner et al., 1990].

2.7.2 Die Polyketidsynthasen (PKS)

Polyketidsynthasen (PKS) sind Multienzymkomplexe, die ähnlich den Fettsäuresynthasen die Verknüpfung von Acyleinheiten katalysieren [Hopwood, 1997]. Die synthetisierten Polyketide besitzen vielfach interessante biologische und pharmakologische Eigenschaften. Beispiele sind das Antibiotikum Erythromycin und das immunsuppressiv wirkende Polyketid FK506.

Die Typ I PKSs besitzen, analog den NRPSs, einen modularen Aufbau, wobei jedes Modul für die Erkennung, Aktivierung, Modifikation und den Einbau einer Ketid-Einheit verantwortlich ist. Diese unterschiedlichen Aufgaben werden von distinkten katalytischen Domänen wahrgenommen. Der Acyltransferase-(AT)-Domäne kommt dabei die Aufgabe der Substraterkennung und Aktivierung (vgl. NRPS A-Domäne) zu. Daran schließt sich die Übertragung des Substrats auf das Acyl-Carrier-Protein ACP (vgl. NRPS PCP) an, ehe es von dort auf einen konservierten Cysteinrest im aktiven Zentrum der Ketosynthase-(KS)-Domäne (vgl. NRPS C-Domäne) weitergereicht wird (Abb. 2.14). Nach weiteren modifizierenden Schritten, an denen optionale Domänen, wie die Ketoreduktase (KR), Dehydrogenase (DH) oder Enoylreduktase (ER) beteiligt sind, erfolgt die Abspaltung des Produktes durch eine Terminations-(Te)-Domäne [Cane und Walsh, 1999; Schwarzer und Marahiel, 2001; Walsh, 2004].

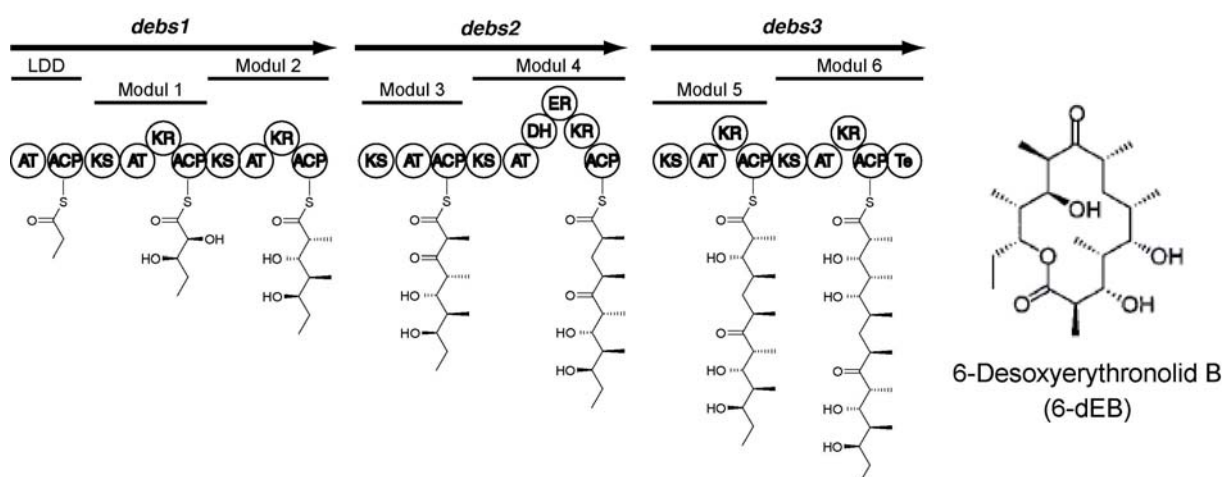


Abb. 2.14: Biosynthese der Erythromycinvorstufe 6-dEB durch die Desoxyerythronolid-B-Synthase (DEBS). DEBS wird von den drei dimodularen Synthasen DEBS1, DEBS2 und DEBS3 synthetisiert, welche von den Genen *debs1*, *debs2* und *debs3* kodiert werden. Die Biosynthese wird durch die am N-Terminus von *debs1* zusätzlich lokalisierte LDD (*loading didomain*) initiiert.

In PKS-Systemen erfolgt die Weiterreichung der ACP-gebundenen Acyleinheiten - analog zu den NRPSs - gerichtet, d.h. sie werden stets vom ACP des stromaufwärts liegenden Moduls zur KS-Domäne des stromabwärts liegenden übertragen. Ausnahme bilden iterative (Typ II) Systeme, in denen die Kette mehrmals zwischen der gleichen ACP und KS-Domäne hin und hergereicht wird. Der intermodulare Transfer erfolgt entweder zwischen zwei kovalent verknüpften Modulen (intramolekulare Verbindung) oder zwischen Modulen, die auf zwei benachbarten Synthasen lokalisiert sind (intermolekulare Verbindung). Obwohl PKS-Module inhärente Spezifitäten gegenüber ihren Substraten besitzen, verhalten sie sich doch tolerant in Bezug auf stereochemische Veränderungen in den Substraten. Die Substratspezifität der Module ist daher nicht der limitierende Faktor hinsichtlich des intermodularen (und intramolekularen) Transfers [Wu et al., 2001].

Die produktive (intermolekulare) Interaktion zwischen Partner-PKSs wird durch sogenannte Linker-Regionen (in der Literatur auch als Docking-Domänen bezeichnet) vermittelt. Dieser Sachverhalt wurde im DEBS-Biosynthesesystem, das die Vorstufe des Antibiotikums Erythromycin bildet, untersucht. Durch Austausch und Fusion der aus 30-90 hypervariablen Aminosäureresten bestehenden Linker-Regionen, wurde deren Einfluss auf eine positive Interaktion in einem Minimalsystem bestehend aus LDD (*loading didomain*) und zwei DEBS-Modulen studiert. Es zeigte sich, dass es nur dann zu einer positiven Interaktion und Erkennung zwischen zwei Modulen kommt, wenn deren Linker-Paar von zwei Linkern gebildet wird, die im natürlichen System benachbart sind [Gokhale et al., 1999] [Tsuji et al., 2001] (Abb. 2.15).

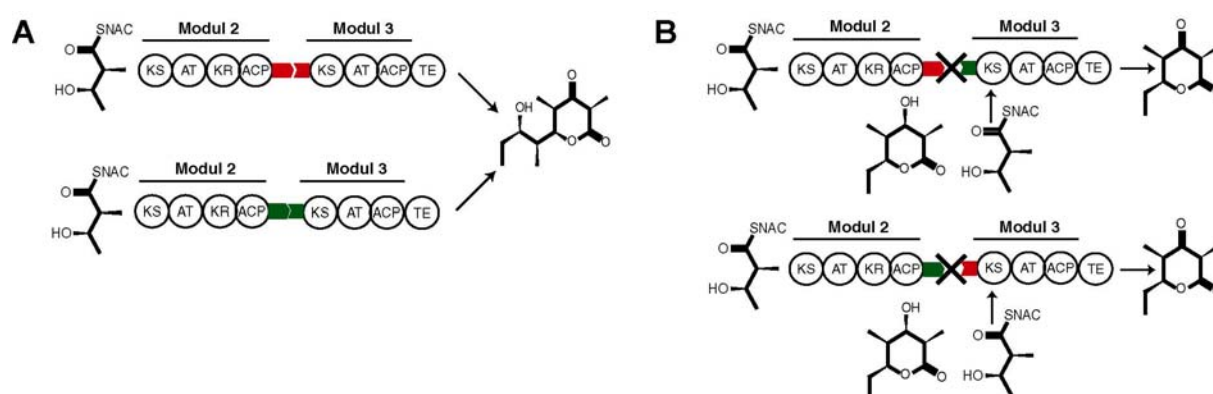


Abb. 2.15: Intermolekulare Kommunikation im DEBS-Biosynthesesystem. Sind die Module 2 und 3, die im natürlichen System auf zwei unterschiedlichen Synthasen lokalisiert sind, durch ein Linkerpaar verbunden, das normalerweise interagiert, so erfolgt die Bildung des erwarteten Triketids (A). Linkerkombinationen aus natürlich nicht benachbarten Linkerpaaren führen dagegen zur Bildung zweier Diketide infolge der zerstörten Kommunikation zwischen Modul 2 und 3 (B). In beiden Fällen wurde ein Acyl-SNAC als Mimic für die Startereinheit (LDD) verwendet.

Mittlerweile konnte das Zusammenspiel eines Linkerpaares mithilfe der NMR-Strukturanalyse weiter untersucht werden. Die zuvor Linkerregionen genannten Bereiche wurden daraufhin als eigenständige Domänen definiert und als Docking-Domänen bezeichnet.

Aufgrund der NMR-Struktur zeigte sich, dass die Interaktion zwischen zwei Synthasen die Folge des Zusammenspiels eines dimeren 4-Helix-Bündels ist, welches durch mehrere hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird (Abb. 2.16). Drei dieser Helices werden von ca. 90 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Donormoduls gebildet, die vierte Helix entstammt dem N-Terminus des Akzeptormoduls und umfasst ca. 30 Aminosäuren der ca. 120 Aminosäuren großen Docking-Domäne [Broadhurst et al., 2003]. Unverstanden bleibt jedoch nach wie vor, wie es gelingt, ACP und KS-Domäne räumlich so zu nähern, dass es zu einem direkten Acyltransfer über die Nahtstelle zweier Synthasen hinweg kommen kann.

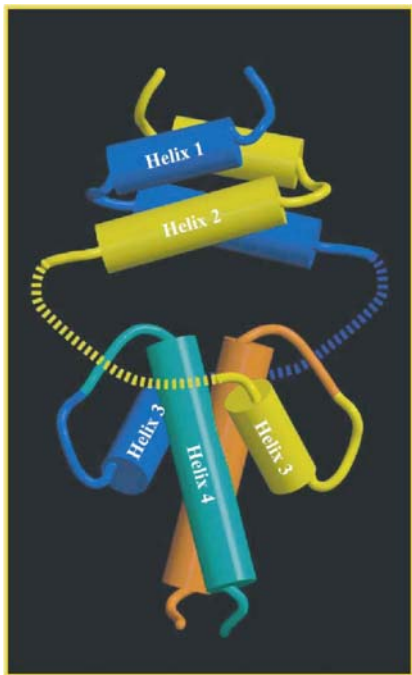


Abb. 2.16: Docking-Domänen bilden ein dimeres 4-Helix-Bündel

Die intermolekulare Erkennung in Polyketidsynthasen wird durch Docking-Domänen gesteuert. Diese 120 Aminosäuren umfassenden Domänen bilden ein dimeres 4-Helix-Bündel aus, von denen die Helices 1-3 vom C-Terminus des Donormoduls gestellt werden und der N-Terminus des Akzeptormoduls die 4. Helix beisteuert. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Helices sorgen für die Stabilität und sind gleichzeitig ein wichtiges Kriterium für die Interaktion der einzelnen Helices (aus Broadhurst et al., *Chem Biol*, 2003).

2.8 Aufgabenstellung

Multienzymkomplexe haben effiziente Methoden etabliert, die es ihnen erlauben, spezifisch eine Erkennung zwischen den an einer Reaktionfolge beteiligten Untereinheiten auszulösen und zu steuern. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde postuliert, dass ähnlich den Termini nichtribosomaler Peptidsynthetasen eine massgebliche Bedeutung für die Erkennung und intermolekulare Kommunikation zukommt wie den gerade beschriebenen Linker-Regionen in PKSs.

Im Rahmen dieser Arbeit beschäftigte ich mich mit der Klärung der Fragen, welche Faktoren die selektive und produktive Interaktion in nichtribosomalen Peptidsynthetasen beeinflussen und steuern und ob die Termini von Peptidsynthetasen an der Erkennung maßgeblich beteiligt sind. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend sollten allgemeine Regeln aufgestellt werden, um eine Interaktion zwischen beliebigen Synthetasen selektiv herbeizuführen. Dies sollte weiterhin zur Generierung eines Universellen Kommunikationssystems führen, das die Bildung neuartiger hybrider Peptidsynthetase-Komplexe ermöglicht.

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten im Modellsystem des Tyrocidin-Biosynthesekomplexes die verantwortlichen Faktoren, Kontrollmechanismen und Bereiche identifiziert, lokalisiert und biochemisch analysiert werden, die für die Interaktion zweier Peptidsynthetasen verantwortlich sind. Weiterhin sollte versucht werden, durch Modifizierung dieser Bereiche die Kommunikation zu unterbrechen, bzw. durch gezielte Kombination von NRPS-Modulen aus unterschiedlichen Biosynthesesystemen neue hybride und funktionelle Peptide zu generieren.

3 MATERIAL

3.1 Geräte

Tab. 3.1: Verwendete Geräte, Hersteller und Typenbezeichnung

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autoklav	<i>Tuttnauer 5075 ELV</i>
DNA-Agarosegel-Dokumentation	Videokamera <i>Cybertech CS1</i>
DNA-Sequencer	Thermodrucker <i>Mitsubishi Video Copy Processor</i> <i>PE Applied Biosystems ABI Prism 310 Genetic Analyser</i>
Elektroporationspulser	<i>Biorad Gene Pulser II</i>
ESI-MS-System	<i>Hewlett Packard Series 1100</i>
FPLC-Säulen	<i>Amersham Biosciences Chelating-Column HR 10/2</i>
FPLC-System	<i>Pharmacia FPLC-System</i> Gradienten-Programmer GP-250, Pumpe P-500, Uvicord Optische und Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal- Flachbrettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3- Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100
Schüttelinkubator	<i>Eppendorf Thermomixer Comfort</i>
HPLC-Säule	<i>Macherey & Nagel C250/3 Nucleodur 120-3 C18</i> <i>Macherey & Nagel C125/3 Nucleosil 120-3 C18</i>
HPLC-System	<i>Agilent HPLC-System mit DAD- und MSD-Detektor,</i> Vakuumentgaser, quarternärer Pumpe und HPChemstation 1100 MSD Series <i>Beckman-Coulter System Gold®</i>
Photometer	<i>Pharmacia Ultrospec 3000 UV/Visibile</i> Spectrophotometer
Reinstwasseranlage	<i>Seral Seralpur Pro 90 C</i>
Speed-Vac	<i>Uniequip Univapo 150 H</i>
Szintillationszähler	<i>Packard TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 2100TR</i>
Thermocycler	<i>Eppendorf Mastercycler Personal</i> <i>Perkin Elmer Gene Amp System 2400</i> <i>Perkin Elmer Gene Amp System 9600</i>
Wasserbad	<i>Infors Aquatron Rundschüttelmaschine</i>

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Zellaufschluss	<i>SLM Aminco</i> French Pressure Cell Press
Zentrifugen	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5415D <i>Heraeus</i> Microfuge pico, <i>Heraeus</i> Microfuge RF <i>Heraeus</i> Megafuge 1.OR <i>Sorvall</i> RC 26 Plus, <i>Sorvall</i> RC 5B Plus

3.2 Chemikalien, Enzyme und Laborprodukte

Chemikalien und Laborprodukte, welche in Tabelle 3.2 nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Herstellern *Aldrich* (Steinheim), *Invitrogen* (Karlsruhe), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) oder *Sigma* (Deisenhofen) bezogen.

Tab. 3.2: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Laborprodukte

Hersteller	Produkt
<i>Amersham Biosciences Europe</i> (Freiburg)	Lysozym, Ampicillin, Kanamycin, Hefeextrakt, IPTG, Proteinase K, RNase A, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1
<i>Appli Chem</i> (Darmstadt)	Hefeextrakt, Trypton, IPTG
<i>Eurogentech</i> (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
<i>Fluka</i> (Neu-Ulm)	SDS
<i>Hartmann-Analytik</i> (Braunschweig)	[³ H]- und [¹⁴ C]-markierte Aminosäuren
<i>ICN-Biochemicals, Inc.</i> (Eschwege)	[¹⁴ C]-markierte Aminosäuren
<i>Macherey & Nagel</i> (Düren)	Nucleospin Extrakt
<i>Millipore</i> (Schwalbach)	Amicon Ultra
<i>MWG-Biotech</i> (Ebersbach)	Oligonukleotide
<i>NEN Life Science Products</i> (Köln)	[³² P]-markiertes Pyrophosphat
<i>New England Biolabs</i> (Frankfurt a.M.)	Restriktionsendonukleasen

3.3 Mikroorganismen

3.3.1 *E. coli* XL1-Blue

Klonierungsarbeiten wurden mit dem *E. coli* XL1-Blue-Stamm (*Stratagene*, Heidelberg) oder den nachfolgend beschriebenen *E. coli* Stämmen XL10-Gold, TOP10 und DH5 α durchgeführt. *E. coli* XL1-Blue besitzt den Genotyp *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, *lac*, F[*proAB*⁺, *lacI*^f, *lacZ* Δ M15, Tn10 (Tet^r)] [Bullock *et al.*, 1987]

3.3.2 *E. coli* XL10-Gold

Alternativ wurde auch der *E. coli* XL10 Gold-Stamm (*Stratagene*, Heidelberg) mit dem Genotyp Tet^r *D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F'*proAB*⁺, *lacI*^f, *lacZ* Δ M15, Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a verwendet.

3.3.3 *E. coli* TOP10

Der *E. coli* TOP10-Stamm (*Stratagene*, Heidelberg) mit dem Genotyp F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* wurde ebenfalls für Klonierungsarbeiten verwendet.*

3.3.4 *E. coli* DH5 α

Für Klonierungsarbeiten wurde auch der *E. coli* DH5 α -Stamm (*Invitrogen*, Karlsruhe) mit dem Genotyp F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *supE44*, λ^- *thi-1*, *gyrA96*, *relA1* eingesetzt.

3.3.5 *E. coli* M15

Für die Expression der rekombinanten NRPS-Gene wurde überwiegend der *E. coli* M15 Stamm in Verbindung mit dem pRep4-Plasmid verwendet. Er besitzt eine T5-Polymerase und den Genotyp *ara*, *gal*, *lacI*, *mtl*, *naI*^s, *rif*^s, *str*^s, F⁻ [Zamenhof und Villarejo, 1972].

3.3.6 *E. coli* BL21

Ebenfalls zum Einsatz kam der *E. coli* BL21/pREP4[gsp]-Stamm, ein Derivat des *E. coli* BL21(λ DE3) mit dem Genotyp F^- , *dcm*, *hsdS* $r_B^-m_B^-$, *ompT*, *gal* [Chambers, 1987]. Diesem Stamm fehlen die Proteasen Ion und OmpT [Grodberg und Dunn, 1988]. Zusammen mit *lacZ* und dem Promotor *lacV5* ist das Gen der T7-Polymerase auf einem Prophagen ins Chromosom integriert [Studier und Moffatt, 1986]. Durch die Kombination mit dem Helferplasmid pREP4[gsp] (vgl. Kap. 3.2.4) erlaubt dieser Stamm die Produktion rekombinanter Proteine in aktiver *holo*-Form.

3.3.7 *E. coli* HM0079

Der *E. coli* Stamm HM0079 ist ein Derivat des *E. coli* Stammes GT869 und zeichnet sich durch die Integration einer Kopie des Pantransferasegens *sfp* in das Chromosom aus [Gruenewald et al., 2004]. Dieser Stamm ermöglicht die gleichzeitige Expression zweier Genprodukte und wurde im Rahmen der *in vivo*-Untersuchungen im Zweiplasmidsystem eingesetzt.

3.3.8 *Bacillus brevis* ATCC 8185

Wildtyp-Stamm, Tyrocidin-Produzent [Mootz und Marahiel, 1997].

3.3.9 *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Wildtyp-Stamm, Surfactin-Produzent [Cooper et al., 1981].

3.3.10 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Wildtyp-Stamm, Mycosubtilin-Produzent [Duitman et al., 1999].

3.3.11 *Bacillus licheniformis* ATCC 10716

Wildtyp-Stamm, Bacitracin-Produzent [Johnson et al, 1945].

3.4 Vektoren

3.4.1 *pTrcHis-TOPO[®]* und *pTrcHis2-TOPO[®]*

Die Vektoren *pTrcHis-TOPO[®]* (4390 bp) und *pTrcHis2-TOPO[®]* (4381 bp) (*Invitrogen*, Karlsruhe) ermöglichen die direkte Insertion von PCR-Produkten, welche an den 3'-Enden A-Überhänge besitzen (TOPO[®]-Klonierung). Zudem erlauben sie die rekombinante Produktion His6-getaggtter Proteine (*pTrcHis-TOPO[®]* N-terminal; *pTrcHis2-TOPO[®]* C-terminal). Sie enthalten den *trc*-Promotor, der ein Hybrid aus der –35 Region des *trpB* Promoters und der –10 Region des *lacUV5* Promoters zur Expression in *E. coli* ist [Brosius et al., 1985; Egon et al., 1983; Mulligan et al., 1985]. Die *lacO*-Sequenz, welche den Lac-Repressor bindet, wird durch das *lacI^q* Gen kodiert. In Abwesenheit von IPTG bindet der Lac-Repressor an der *lacO*-Sequenz, wodurch die Transkription unterdrückt wird [Jacob und Monod, 1961; Müller-Hill et al., 1968]. Zusätzlich verhindert die Antiterminationssequenz *rrnB* eine vorzeitige Beendigung der Transkription [Li et al., 1984].

3.4.2 *pQE60*

Der *pQE60*-Vektor (3431 bp) (*Qiagen*, Hilden) gehört zu der Familie der *pDS*-Plasmide [Bujard et al., 1987] und basiert auf dem Plasmid *pDS56/RBSII* [Stüber et al., 1990]. Er besitzt den T5-Promotor, zwei *lac*-Operatorerkennungssequenzen und eine synthetische ribosomale Bindungsstelle, die auf hohe Expressionsraten in *E. coli* optimiert ist. Eine *in-frame* Ligation in die MCS, bestehend aus den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *NcoI*, *BamHI* und *BglII*, führt zu einer C-terminalen Fusion der rekombinanten Proteine mit einem Hexahistidin-*tag* (His₆-*tag*). Das Plasmid verleiht durch Expression des β -Lactamasegens *bla* Resistenz gegen Ampicillin und repliziert in *E. coli* mittels des ColE1 Replikationsursprunges aus *pBR322* [Scutcliffe, 1979]. Die Genexpression im Plasmid *pQE60* ist aufgrund der optimierten Promotorregion sehr effizient und kann nur in Gegenwart extrem hoher *lac*-Repressorkonzentrationen vollständig unterdrückt werden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor *pREP4* verwendet (vgl 3.2.4).

3.4.3 pQE70

Der Vektor pQE70 (Qiagen, Hilden) gehört ebenfalls zur Familie der pDS-Plasmide. Dieser 3426 bp umfassende Vektor enthält die gleichen Komponenten wie der zuvor beschriebene pQE60. Einziger Unterschied ist die MCS, die sich im Fall des pQE70 aus den Restriktionsschnittstellen *SphI*, *BamHI* und *BglII* zusammensetzt. Das ATG-Startcodon ist Bestandteil der *SphI*-Erkennungssequenz. Expressionen von Genen im pQE70-Vektor führen ebenfalls zur Produktion von Proteinen mit C-terminalem His₆-tag.

3.4.4 pREP4 und pREP4-gsp

Das Plasmid pREP4 (3740 bp) (Qiagen, Hilden) ist mit seinem Replikationsursprung P15A [Miller, 1992] kompatibel zu ColE1-Plasmiden und kann so in Kombination mit pQE-Vektoren in *E. coli* repliziert werden. Neben dem *neo*-Gen, das Resistenz gegen Kanamycin vermittelt, trägt es das *lacI*-Gen, welches für den Lac-Repressor kodiert [Farabough, 1978]. pREP4 wurde als Helferplasmid in Kombination mit pQE-Vektoren verwendet, um durch die *lac*-Repressorproduktion eine Regulation der Expression der enthaltenen Gene zu ermöglichen.

Das Gen *gsp* kodiert für die Ppant-Transferase des Gramicidin S-Biosynthesystems. Es wurde im Plasmid pREP4-gsp unter Kontrolle des T7-Promotors [Studier & Moffatt, 1986] in den Vektor pREP4 integriert um eine Koexpression der NRPS-Proteine mit einer Ppant-Transferase und damit die Modifikation zur *holo*-Form *in vivo* zu ermöglichen [Dökel & Marahiel, 1997].

3.4.5 pSU18

Der Vektor pSU18 [Bartolomé *et al.*, 1991] ist ein Derivat von pACYC184 und ist sehr ähnlich zu pUC18, basiert jedoch auf dem Replikationsursprung P15A [Miller, 1992] und vermittelt durch das *cat*-Gen Resistenz gegen Chloramphenicol. Die in das *lacZ'*-Gen integrierte MCS erlaubt ein Blau-Weiß-Screening auf rekombinante Plasmide. Restriktionsschnittstellen der MCS von pSU18 in der Reihenfolge der Orientierung des *lac*-Promotors: *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *AvaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *HincII*, *AccI*, *BspMI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*.

3.5 Medien

Zur Anzucht der verwendeten Mikroorganismen wurde LB-, 2xYT-, oder M9-Minimalmedium verwendet [Sambrook et al., 1989]. Während LB und 2xYT-Medium in erster Linie bei Klonierungsexperimenten und für die Überproduktion von Proteinen eingesetzt wurde, fand M9-Minimalmedium bei *in vivo*-Untersuchungen Verwendung. Festmedium wurde durch Zugabe von 1,2% (w/v) Agar Nr.1 vor dem Autoklavieren (121°C, 1,5 bar, 20 min) hergestellt. Bei Expressionen wurden gegebenenfalls 10 mM MgCl₂ zugesetzt, um die Löslichkeit der produzierten Proteine zu erhöhen. Nach Bedarf wurden dem Medium in den Standardkonzentrationen 100 µg/mL Ampicillin, 25 µg/mL Kanamycin und 30 µg/mL Chloramphenicol zugesetzt.

LB-Medium	Bactotrypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L
2xYT-Medium	Bactotrypton	16 g/L
	Hefeextrakt	10 g/L
	NaCl	5 g/L
M9-Medium	Di-Kaliumhydrogenphosphat	10,5 g/L
	Natriumdihydrogenphosphat	4,5 g/L
	Natriumcitrat	0,5 g/L
	Ammoniumsulfat	1,0 g/L
	Magnesiumsulfat	10 g/L
	Calciumchlorid	10 g/L
	Glucose	4 g/L
getrennt autoklaviert	Biotin und Thiamin	2 mg/L
getrennt autoklaviert		
steril filtriert		
steril filtriert		

4 METHODEN

4.1 Molekularbiologische Methoden

Ein Grossteil der in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologische Methoden sind etablierte und veröffentlichte Standardtechniken [Sambrook et al, 1989]. Aus diesem Grund werden in diesem Abschnitt nur die Konstruktionen der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und von der Standardmethode abweichende Verfahren beschrieben.

4.1.1 Konstruktion der Plasmide

Die für die Klonierung erforderlichen Genfragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des „*Expand long template PCR system*“ (Roche, Mannheim), oder des TOPO[®]-Cloning Kits (*Invitrogen*,) nach den Angaben des Herstellers amplifiziert. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wurden durch synthetische Oligonukleotide eingeführt (MWG-Biotech, Ebersberg). Die Reinigung der PCR Ansätze erfolgte mit dem „*QIAquick spin PCR Purification Kit*“, dem „*QIAEX II Purification Kit*“ (*Qiagen*, Hilden) oder dem „*Nucleospin Extract Kit*“ (*Macherey & Nagel*, Düren) gemäß den Herstellerangaben. Die ortsgerichtete Mutagenese der COM-Domäne sowie der Initiationsmodule erfolgte unter Verwendung des „*Quick Site Directed Mutagenesis Kit*“ (*Stratagene*, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers. Chromosomale DNA der Produzentenstämme, die als Templat in der PCR diente, wurde mittels Anionenaustauscher-Chromatographie mit „Tip-100 Säulen“ (*Qiagen*), gereinigt [Vogelstein und Gillespie, 1979]. Die Präparation der Plasmide aus *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979]. Die Integrität der Plasmide wurde durch Restriktionsverdaue sowie durch Sequenzierungsexperimente verifiziert.

Die Klonierung in TOPO[®]-Vektoren basiert auf der Bindung doppelsträngiger DNA an spezifischen Stellen der Topoisomerase I des *Vaccinia* Virus und der daraus resultierenden Spaltung des Phosphodiester-Rückgrates hinter der Erkennungssequenz 5'-CCCTT [Shuman, 1991]. Die dabei freiwerdende Energie wird durch Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des geschnittenen Stranges und dem Tyrosin-Rest T274 der Topoisomerase I konserviert. Die

Phospho-Tyrosyl-Bindung zwischen DNA und Enzym wird anschließend durch die 5'-Hydroxylgruppe des geschnittenen Stranges angegriffen, wodurch es zum Einbau des PCR-Fragmentes in den Vektor und zur Abspaltung der Topoisomerase kommt.

4.1.1.1 Plasmide der C-terminalen Verkürzungsmutanten und des COM-Domänenprojektes

Die kodierenden Genbereiche, der im Rahmen der Untersuchungen C-terminaler Verkürzungsmutanten und des COM-Domänen austausches verwendeten Plasmide, wurden durch PCR aus chromosomaler DNA des Tyrocidin-Produzentenstammes *Bacillus brevis* ATCC 8185 erhalten. Für die Konstruktion der COM-Domänen austauschplasmide wurde das SOE-Verfahren („*gene splicing by overlapping extension*“) verwendet [Horton et al., 1989]. Hierbei wurden zunächst zwei Sätze an Oligonukleotiden verwendet, um mittels PCR zwei DNA-Fragmente mit überlappenden Enden zu generieren. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in einem zweiten PCR-Schritt vereint, wobei sich die denaturierten, einzelsträngigen Fragmente zusammenlagerten und als Primer für die Synthese des jeweils anderen Genabschnittes fungierten. In den folgenden Konstruktbezeichnungen sind Gene, die für nativ zusammengehörige Domänen kodieren in eckigen Klammern zusammengefasst.

Alle konstruierten Plasmide basieren auf den TOPO[®]-Vektoren pTrcHis oder pTrcHis2, wobei Donormodule unter Verwendung des pTrcHis-TOPO einen N-terminalen Hexahistidin-*tag* (His₆-*tag*) tragen und Akzeptormodule bedingt durch die Klonierung in pTrcHis2-TOPO einen C-terminalen His₆-*tag* besitzen.

pTrcHis-tycA: Das DNA-Fragment [A-PCP-E], welches für die Domänen A-PCP-E des Initiationsmoduls der Tyrocidin-Synthetase A (TycA) kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden 5'-tycA 5'-ATG TTA GCA AAT CAG GCC AAT CTC ATC G-3' und 3'-tycA 5'-TTA GCG CAG TGT ATT TGC AAG CAA TTC G-3' aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert. Das 3267 bp umfassende Fragment wurde anschließend gereinigt und in den pTrcHis-TOPO[®]-Vektor ligiert, was zur Bildung des gewünschten Plasmids führte.

pTrcHis-tycA Δ 03- Δ 23: Die Plasmide zur Produktion der Verkürzungsmutanten wurden analog zur Konstruktion des Plasmids pTrcHis-tycA hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Genbereiche mittels PCR aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert. Da sie sich die Klonierungsstrategie der Plasmide **pTrcHis-tycA Δ 03- Δ 23** nur in den verwendeten 3'-Oligonukleotiden unterscheiden, wird ihre Konstruktion hier zusammen beschrieben. Der jeweiligen Bezeichnung des Plasmid folgen die Angabe der Fragmentgröße, sowie des verwendeten 3-Primers. Als 5'-Primer wurde stets das Oligonukleotid 5'-tycA eingesetzt. **pTrcHis-tycA Δ 03**, (3258 bp), 3'-tycA Δ 03 5'-TTA ATT TGC AAG CAA TTC GAA GAT ATC GTC-3'; **pTrcHis-tycA Δ 06** (3249 bp), 3'-tycA Δ 06 5'-TTA CAA TTC GAA GAT ATC GTC CAT TTC TTC-3'; **pTrcHis-tycA Δ 09** (3240 bp), 3'-tycA Δ 09 5'-TTA GAT ATC GTC CAT TTC TTC CAT TTG GAG-3'; **pTrcHis-tycA Δ 12** (3231 bp), 3'-tycA Δ 12 5'-TTA CAT TTC TTC CAT TTG GAG ACC TTT GAC-3'; **pTrcHis-tycA Δ 15** (3222 bp), 3'-tycA Δ 15 5'-TTA CAT TTG GAG ACC TTT GAC GCT GAA ATC-3'; **pTrcHis-tycA Δ 23** (3198 bp), 3'-tycA Δ 23 5'-TTA ATC GCT GGG CGT TCG CTC TAC TTC-3'.

pTrcHis-tycB3: Analog zum Plasmid pTrcHis-tycA erfolgte die Konstruktion des entsprechenden DNA-Fragments, welches für die Domänen A-PCP-E von TycB3 kodiert, unter Verwendung der Oligonucleotide 5'-tycB3 5'-AAT CCG GAA AAT GAA TTG CAA GAG ATC GAG-3' und 3'-tycB3 5'-TCA AAT CCA TTC CAG GAT GTT TTC CAG CTC-3' durch Amplifizierung aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185. Das 3237 bp umfassende Fragment wurde anschließend gereinigt und in den pTrcHis-TOPO[®]-Vektor ligiert, was zur Bildung des gewünschten Plasmids führte.

pTrcHis2-tycB1: Das DNA-Fragment, welches für die Domänen C-A-PCP des ersten Elongationsmoduls der Tyrocidin-Synthetase B (TycB1) kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden 5'-tycB1 5'-ATG AGT GTA TTT AGC AAA GAA CAA GTT CAG G-3' und 3'-tycB1 5'-TCA CTC CCC GCC TTC CAC ATA CGC-3' aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert. Das 3137 bp umfassende Fragment wurde anschließend gereinigt und in den pTrcHis2-TOPO[®]-Vektor ligiert, was zur Bildung des gewünschten Plasmids führte.

pTrcHis2-tycC1: Das DNA-Fragment, welches für die Domänen C-A-PCP des ersten Elongationsmoduls der Tyrocidin-Synthetase C (TycC1) kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden 5'-tycC1 5'-ATG AGT GTA TTT AGC AAA GAA CAA GTT CAG G-3' und 3'-tycC1 5'-TCA TTC CGA CCG CGA AAG GAA GCG G-3' aus chromosomaler DNA von *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert. Das 3123 bp umfassende Fragment wurde anschließend gereinigt und in den pTrcHis2-TOPO®-Vektor ligiert, was zur Bildung des gewünschten Plasmids führte.

pTrcHis-tycA(B3): In diesem Plasmid wurde mittels der SOE-Methode die C-terminale COM-Domäne von TycA durch die entsprechende COM-Domäne von TycB3 ersetzt. Dazu wurden zunächst in separaten PCR-Reaktionen unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-tycA 5'-ATG TTA GCA AAT CAG GCC AAT CTC ATC G-3' und 3'-tycA_fusion(B3) 5'-GCT CTT CAT CCC CCA GGT CGC TGG GCG TTC GCT CTA CTT CTT TTT TCT C-3' bzw. 5'-tycA_fusion(B3) 5'-GAG AAA AAA GAA GTA GAG CGA ACG CCC AGC GAC CTG GGG GAT GAA GAG C-3' und 3'-tycB3 5'-TCA AAT CCA TTC CAG GAT GTT TTC CAG CTC-3' zwei DNA-Fragmente amplifiziert, die nach Reinigung in einem weiteren PCR-Schritt als Templat eingesetzt wurden und unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-tycA und 3'-tycB3 zur Bildung des gewünschten Genbereichs führten. Nach Reinigung des 3263 bp umfassenden DNA-Fragments erfolgte wie zuvor schon beschrieben die Ligation in den pTrcHis-TOPO®-Vektor.

pTrcHis-tycB3(A), pTrcHis2-(C1)tycB1 und pTrcHis2-(B1)tycC1: Alle diese hybriden Plasmide sind gekennzeichnet durch den Austausch der kodierenden Bereiche für die C- bzw. N-terminale COM-Domäne. Dieser Austausch erfolgte mittels SOE-Methode in Analogie zu der zuvor beschriebenen Weise. Für die Konstruktion von **pTrcHis-tycB3(A)** wurden in der ersten PCR-Runde die Oligonukleotidkombinationen 5'-tycB3 5'-AAT CCG GAA AAT GAA TTG CAA GAG ATC GAG-3' und 3'-tycB3_fusion(A) 5'-GGA GAC CTT TGA CGC TGA AAT CGC TCG GGG TGT ACT CGC CTT CTT CTT TTG-3' bzw. 5'-tycB3_fusion(A) 5'-CAA AAG AAG AAG GCG AGT ACA CCC CGA GCG ATT TCA GCG TCA AAG GTC TCC-3' und 3'-tycA 5'-TTA GCG CAG TGT ATT TGC AAG CAA TTC G-3' verwendet. Der Einsatz der beiden amplifizierten DNA-Fragmente und der Oligonukleotide 5'-tycB3 und 3'-tycA ergab in einer zweiten PCR-Runde den

gewünschten Genbereich mit einer Größe von 3255 bp, der in den pTrcHis-TOPO®-Vektor ligiert wurde. Der für (C1)TycB1 kodierende Genbereich des Plasmids **pTrcHis2-(C1)tycB1** besitzt eine Größe von 3144 bp und wurde durch die Oligonukleotidkombinationen 5'-tycC1 5'-ATG AAA AAG CAG GAA AAC ATC GCA AAA ATT TAC C-3' und 3'-(C1)fusion_tycB1 5'-CGT GAA ACA GCA TCC CCT CTT GCA TTG GGG TTA GCG GGT AAA TTT TTG CGA TG-3' bzw. 5'-(C1)fusion_tycB1 5'-CAT CGC AAA AAT TTA CCC GCT AAC CCC AAT GCA AGA GGG GAT GCT GTT TCA CG-3' und 3'-tycB1 5'-TCA CTC CCC GCC TTC CAC ATA CGC-3' sowie in der zweiten Runde durch Verwendung der Primer 5'-tycC1 und 3'-tycB1 konstruiert. Durch die Ligation des erhaltenen Amplifikats in den pTrcHis2-TOPO®-Vektor konnte das gewünschte Plasmid ebenso erhalten werden wie das Plasmid **pTrcHis2-(B1)tycC1**. Dessen kodierender Genbereich mit einer Größe von 3128 bp wurde durch die Verwendung der Oligonukleotide 5'-tycB1 5'-ATG AGT GTA TTT AGC AAA GAA CAA GTT CAG G-3' und 3'-(B1)fusion_tycC1 5'-CAG CGT GAA ACA ACA TAC CCT CTT GCA ACG GGG TCA ACG CAT ACA TAT CCT G-3' bzw. 5'-(B1)fusion_tycC1 5'-CAG GAT ATG TAT GCG TTG ACC CCG TTG CAA GAG GGT ATG TTG TTT CAC GCT G-3' und 3'-tycC1 5'-TCA TTC CGA CCG CGA AAG GAA GCG G-3', welche in der ersten PCR-Runde sowie den Primern 5'-tycB1 und 3'-tycC1 in der zweiten Runde konstruiert.

pTrcHis-tycA(A) Δ E: Das Genprodukt dieses Konstrukts diene als Initiationsmodul im Universellen Kommunikationssystem und zeichnet sich durch die Deletion der gesamten E-Domäne aus. Das entsprechende Plasmid wurde ausgehend von pTrcHis-tycA generiert. Durch inverse PCR mit den Oligonukleotiden 5'-TycA(A) Δ E (*Bgl*II) 5'-AAA **AGA TCT** GAG CGA ACG CCC AGC G-3' und 3'-TycA(A) Δ E (*Bgl*II) 5'-TTT **AGA TCT** GCT CTT GAC AAA AAG AGC AAC C-3' wurde das Plasmid zunächst linearisiert, mit *Bgl*II geschnitten und anschließend religiert, wodurch **pTrcHis-tycA(A) Δ E** erhalten wurde. Die Fusionsstelle zwischen PCP und COM(A) wurde wie zuvor für Modulfusionen beschrieben auf die Aminosäuren 38 und 39 stromabwärts des hochkonservierten Serinrests im Core-Motiv der PCP-Domäne gelegt [Mootz et al., 2000].

pTrcHis-tycA H743A: Die Generierung dieses Plasmids erfolgte ausgehend von Plasmid pTrcHis-tycA. Die Einführung der Mutationen erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem „*Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit*“ (Stratagene, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers mit den nachfolgenden Primern TycA H743A_for und TycA H743A_rev. Mutierte Basen sind fett hervorgehoben, die betroffenen Codons sind unterstrichen.

TycA H743A_for: 5'-TTT CTC GCA ATT CAT **GCA** TTG GTC GTC GAT
GGG ATT TCC-3'

TycA H743A_rev: 5'-CAT CCA CGA CCA **ATG** **CAT** GAA TTG CGA GAA
ACA AAT GAT CG-3'

4.1.1.2 Plasmide des Zweiplasmidsystems

Das im Rahmen der *in vivo*-Untersuchungen verwendete Zweiplasmidsystem beruht auf der Nutzung pSU18 und pTRc99a basierter Plasmide. Als Akzeptor fungierte das Plasmid **pTRc99a-tycB1**, welches zuvor schon beschrieben wurde [Gruenewald et al., 2004]. Die Konstruktion der entsprechenden Donorplasmide gelang ausgehend von pTrcHis-tycA, bzw. Derivaten hiervon, welche die Genbereiche der jeweiligen Verkürzungsmutanten trugen. Die Genbereiche wurden mit *HincII* herausgeschnitten, gereinigt und anschließend in den entsprechend linearisierten Vektor pSU18 ligiert. Auf diese Weise wurden die Plasmide **pSU18-tycA** bzw. **pSU18-tycA Δ 103- Δ 123** erhalten.

4.1.1.3 Plasmide zur Mutationsanalyse von COM-Domänen

Plasmide, welche für die Mutationsanalyse der COM-Domänen hergestellt wurden, basieren auf den entsprechenden pTrcHis- bzw. pTrcHis2-Plasmiden. Die Einführung der Mutationen erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem „*Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit*“ (Stratagene, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers. Nachfolgend sind die aus der Mutagenese hervorgegangenen Plasmide und die jeweils verwendeten Oligonukleotide aufgeführt (mutierte Basen sind fett hervorgehoben, die betroffenen Codons sind unterstrichen).

pTrcHis2-(C1)tycB1 K9D:

(C1)TycB1 K9D: 5'-AGG AAA ACA TCG CAG ATA TTT ACC CGC TAA
CCC CAT TGC-3'

(C1)TycB1 K9D_rev: 5'-GGT TAG CGG GTA AAT ATC TGC GAT GTT TTC
CTG CTT TTC C-3'

4.1.1.4 Plasmide des Universellen Kommunikationssystems (UKS)

Für das Universelle Kommunikationssystem wurden drei unterschiedliche Plasmid-Typen benötigt. Initiationsmodule mussten C-terminal die COM-Domäne von TycA (COM(A)), Terminationsenzyme die COM-Domäne von TycB1 (COM(B1)) oder eine dazu kompatible tragen. Grundlage dieser Plasmide waren existierende auf pTrcHis- oder pTrcHis2-TOPO®-Vektoren basierende Plasmide. Elongationsenzyme hingegen wurden so konzipiert, dass sie N-terminal die COM(B1)-Domäne tragen und C-terminal die COM(A)-Domäne aufweisen. Dies machte die Konstruktion des universellen Kommunikationsvektors pUKS03 erforderlich. Dieser trägt die kodierenden Bereiche der COM-Domänen von TycA (COM(A)) und TycB1 (COM(B1)) und erlaubt durch die Insertion entsprechender für Elongationsenzyme kodierender Genfragmente eine *in frame* Fusion mit den Bereichen der COM-Domänen.

Schnittstellen, die durch die Verwendung der Oligonukleotide eingeführt wurden, sind im folgenden fett dargestellt. Das diese Basensequenz erkennende Restriktionsenzym ist in Klammern im Anschluss an die Primer-Bezeichnung aufgeführt.

pUKS03: Die Konstruktion des Universellen Kommunikationsvektors UKS03 erfolgte in drei Schritten. Die Verwendung chromosomaler DNA des Tyrocidin-Produzentenstammes *B. brevis* ATCC 8185 in Verbindung mit den Oligonukleotiden 5'-F1_COM(B1) (*Pst*I) 5'-AAA **CTG CAG** CCG GAA GAG ACC GAG-3' und 3'-F1_COM(B1) (*Xba*I) 5'-ATC **TCT AGA** GTG CTC TTG ATC GAG C-3' lieferte durch PCR ein 870 bp großes Fragment F1, das Teile der E-Domäne von TycA und die COM(B1)-Domäne enthält. Analog erfolgte die Amplifizierung des 847 bp großen Fragments F2 mittels der Primer 5'-F2_COM(A) (*Nhe*I) 5'-ATC **GCT AGC** GAT TTC AGC GTC AAA GG-3' und 3'-F2_COM(A) (*Acc*I) 5'-AAA **GTC GAC** TGG CGA TGG

TCC-3', welches die COM(A)-Domäne und Teile der C-Domäne von TycB1 aufweist. Die Klonierungsstrategie machte es erforderlich, die Fragmente nacheinander in den pSU18-Vektor zu klonieren. Zunächst wurde Fragment F1 mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Xba*I geschnitten und in den ebenso präparierten pSU18-Vektor ligiert, was zur Bildung von Plasmid **pUKS01** führte. Im Anschluss daran wurde Fragment F2 mit *Nhe*I und *Acl*I geschnitten und in den gleichfalls mit diesen Restriktionsenzymen verdauten pUKS01 ligiert, worauf Plasmid **pUKS02** erhalten werden konnte. Durch diese Klonierungsstrategie konnten die beiden COM-Domänen in invertierter Orientierung und durch eine MCS getrennt angeordnet werden. In einem weiteren PCR-Schritt wurde unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-tycB1 und 3'-tycA_UKS der 438 bp umfassende Genbereich, welcher die beiden COM-Domänen und die MCS enthielt, amplifiziert und nachfolgend in den pTrcHis2-TOPO® ligiert. Dies führte zur Generierung des Plasmids **pUKS03**.

pUKS-(B1)bacB2(A): Ausgehend von chromosomaler DNA des Bacitracin-Produzentenstammes *B. licheniformis* ATCC 10716 wurde mittels PCR und unter Zuhilfenahme der Oligonukleotide 5'-BacB2 (*Nhe*I) 5'-AAA **GCT AGC** TAC AAT ATG CCT TTT GCG-3' und 3'-BacB2 (*Avr*II) 5'-AAA **CCT AGG** CGT TTT TTC GGT TTC ATG-3' der 4365 bp große Genbereich amplifiziert. Das Genfragment, welcher für die Domänenfolge C-A-PCP-E kodiert, wurde mit *Nhe*I und *Avr*II geschnitten und in den mit *Xba*I und *Nhe*I präparierten pUKS03 ligiert. Dies führte zur Insertion des Genfragments zwischen die beiden COM-Domänen und zur Generierung von **pUKS-(B1)bacB2(A)**. Da alle vier Restriktionsstellen kompatibel waren, konnte es zu einer ungerichteten Insertion des Genfragments kommen. Die richtige Orientierung wurde hier, wie auch in allen anderen ungerichtet verlaufenden Klonierungen, durch Restriktionsverdaue und Sequenzierungsexperimente überprüft.

4.1.2 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung zur Überprüfung der konstruierten Plasmide erfolgte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger et al., 1977]. Bei diesem Verfahren werden fluoreszenzmarkierte ddNTPs in DNA Abbaufragmente eingebaut, Die verschiedenen Fluoreszenzmarker für die vier Basen können dann detektiert und damit die Sequenz analysiert werden. Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte unter der Verwendung des "ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits" (ABI, Forster City, USA) anhand des Hersteller-Protokolls. Die Analyse und Auswertung der Sequenzreaktionen erfolgte abschließend unter der Verwendung des "ABI Prism 310 Genetic Analyser" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) sowie des Computerprogramms Chromas. Teilweise wurden Plasmide auch von der Firma GATC (Konstanz) sequenziert.

4.2 Proteinchemische Methoden

Auch im Rahmen der Proteinchemie wurden Standardmethoden angewendet. Diese sind ebenfalls bereits beschrieben worden und werden deswegen hier nicht näher erläutert. Dazu gehören die SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] und die Coomassie-Färbung der SDS-Gele [Bennett und Scott, 1971].

4.2.1 Genexpression im pTrcHis-TOPO-Vektor-System

Die Expression der rekombinanten, in pTrcHis-TOPO oder pTrcHis2-TOPO-Vektoren integrierten Gene erfolgte in den Expressionsstämmen *E. coli* M15-pREP4, *E. coli* BL21-pREP4[gsp] oder *E. coli* HM0079. Diese Stämme wurden mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformiert. Durch den IPTG-induzierten trc-Promotor der pTrcHis-TOPO-Vektoren ist eine kontrollierte Expression möglich. Dazu wurden 300 mL vorgewärmtes LB- oder 2xYT-Medium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (amp⁵⁰, kan²⁵) mit einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionsstamms inokuliert. Die Kulturen zur Produktion der C-terminalen

Verkürzungsmutanten sowie der COM-Domänen austauschkonstrukte wurden bei 37°C und 250 Upm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Genexpression induziert und die Zellen weitere 3 h bei 30°C inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

Die Überproduktion der UKS-Module erfolgte analog. Um die Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu erhöhen, wurden die Zellen aber bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 angezogen, bevor die Induktion mit 0,2 mM IPTG erfolgte. Nach einer Inkubation von abermals 4 h bei 25°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 Upm, 4°C, 10 min) geerntet. Die Zellpellets wurden in 10 mL HEPES A resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

4.2.2 Zellaufschluss

Vor dem Aufschluss der Zellen wurden die Zellpellets in 10 mL des Aufschlusspuffers HEPES A (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Kühlung auf 4°C durch dreimaliges Durchlaufen von Kompression-Dekompressionszyklen an einer „French Press-Zelle“ (SLM Aminco, Waldbronn). Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (17000 Upm, 4°C, 30 min) vom Rohzellextrakt abgetrennt. Der klare Überstand dieser Zentrifugation wurde dann für die Affinitätschromatographie verwendet.

4.2.3 Proteinreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Bedingt durch die Klonierungsstrategien und der verwendeten Vektoren besitzen alle in dieser Arbeit beschriebenen rekombinanten einen terminalen (N- oder C-terminal) Hexahistidin-*tag* (His₆-*tag*), der die einfache und effiziente Reinigung durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-IMAC) ermöglicht. An einer speziellen Säulenmatrix ist Nitrilotriacetat (NTA) gebunden, welches Ni²⁺-Ionen an vier seiner sechs Koordinationsstellen komplexiert und damit an der Säulenmatrix immobilisiert. Die chelatbildenden Histidinreste des His₆-*tags* können die freien Koordinationsstellen der Ni²⁺-Ionen besetzen, sodass die Proteine an der

Säulenmatrix gebunden werden [Porath et al, 1975]. Gebundene Proteine können durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol von der Säule eluiert werden. Auf diese Weise erfolgte die Abtrennung der rekombinanten und mit einem His₆-tag versehenen Proteine aus dem Rohzelleextrakt.

Die Proteinreinigung erfolgte unter Verwendung von Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen, Hilden). Die Reinigung wurde an einer FPLC-Anlage (Amersham Biosciences, Freiburg) bei 4°C durchgeführt. Der Rohzelleextrakt wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf das Säulenmaterial aufgetragen. Der Waschvorgang sowie die nachfolgende Elution des Proteins wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm in einer Durchflusszelle verfolgt. Die Elution des Proteins erfolgte durch Anlegen eines Gradienten von HEPES A zum imidazolhaltigen HEPES B bei einer Flussrate von 1 mL/min. Die Fraktionen wurden im 2,5 mL-Volumen aufgefangen. Nach Bradford-Test [Bradford, 1976] und SDS-PAGE-Analyse wurden die Fraktionen, welche das gewünschte Protein in ausreichender Reinheit enthielten, vereinigt und nachfolgend dialysiert. Die Dialyse diente zum Entfernen des Imidazols, welches die nachfolgenden Untersuchungen stören könnten und zur Umpufferung der rekombinanten Enzyme mit dem für die biochemische Charakterisierung verwendeten Assay-Puffer.

FPLC-Puffer:

HEPES A	HEPES	50 mM, pH 8,0
	NaCl	300 mM
HEPES B	HEPES	50 mM, pH 8,0
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM

Die Konzentrationen der gereinigten Proteine wurden durch Bradford-Test bei einer Absorption von 595 nm [Bradford, 1976] oder einer Absorption bei 280 nm unter Berücksichtigung des berechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt.

4.2.4 Reinigung der rekombinanten NRPS-Synthetasen

Alle rekombinanten Proteine wurden überproduziert und gereinigt wie in den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.3 beschrieben. Vor der Reinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie wurde der Rohzelleextrakt mit HEPES B versetzt (Endkonzentration 2% (v/v)). Die Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule wurde ebenfalls mit 2% (v/v) HEPES B äquilibriert. Damit wurde einer unspezifischen Bindung von Proteinen ohne His₆-tag vorgebeugt. Der Auftrag des Rohzelleextraktes wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Die Elution erfolgte ebenfalls mit 1 mL/min unter Verwendung des folgenden Gradienten.

FPLC-Gradient	0 min	2% HEPES B
	10 min	2% HEPES B
	30 min	40% HEPES B
	35 min	100% HEPES B
	45 min	100% HEPES B
	50 min	0% HEPES B

Die Entfernung des Imidazols aus der Proteinlösung sowie die Umpufferung der gereinigten Enzyme erfolgte durch dreimalige Dialyse gegen das 100fache Volumen des Dialyse-Puffers.

Dialyse-Puffer	HEPES	50 mM, pH 8,0
	NaCl	100 mM
	DTT	2 mM

4.3 Biochemische Charakterisierung – Aktivitätstests

4.3.1 ATP-PP_i-Austauschreaktion

Die Selektivität von NRPS wird durch Adenylierungs-Domänen determiniert, welche die kognaten Aminosäuren unter ATP-Verbrauch und Pyrophosphat-Abspaltung als korrespondierendes Aminoacyl-Adenylat aktivieren [Grevers et al., 1968; Lee und Lipmann, 1975]. Die Reversibilität dieser Reaktion wird ausgenutzt, um die Substrat-Selektivität und die katalytischen Eigenschaften von NRPS A-Domänen zu untersuchen.

Hierbei wird eine A-Domäne mit ihren Substraten (Aminosäure, ATP), dem Kofaktor Mg²⁺ und [³²P]-Pyrophosphat ([³²P]-PP_i) inkubiert. Die Aktivierung der Substrat-Aminosäure führt zur Bildung des Aminoacyl-Adenylates unter der Abspaltung von PP_i. Bei der Rückreaktion kommt es anschließend, durch Inkorporation des [³²P]-PP_i, zur Bildung radioaktiv markierten [³²P]-ATPs. Im Gegensatz zu PP_i wird das enthaltene ATP anschließend durch Adsorption an Aktivkohle gebunden und kann so selektiv aus dem Ansatz abgetrennt werden. Die Inkorporation von [³²P]-markierten ATP im Aktivkohle-Niederschlag steht somit in Abhängigkeit zur Aktivierung der analysierten Aminosäuren durch die zu charakterisierende A-Domänen.

Da in der ATP-PP_i-Austauschreaktion die Rückreaktion verfolgt wird, kann diese Reaktion kein direktes Maß für die Verfügbarkeit des Aminoacyl-Adenylates darstellen. Allerdings ist die Menge des gebildeten [³²P]-ATPs proportional zur ATP-PP_i-Austauschrate und der spezifischen Aminosäure-Aktivierung durch die zu charakterisierende A-Domäne. Die Bestimmung von Blindwerten erfolgt daher in der Abwesenheit von Aminosäure oder ATP.

In parallelen Ansätzen wurden die zu testenden Aminosäuren und Enzyme vorgelegt und mit Puffer auf 50 µL aufgefüllt (Mix1). In einem zweiten Ansatz wurden ATP, PP_i, MgCl₂ und radioaktiv-markiertes [³²P]-PP_i vermischt und mit Puffer auf 50 µL aufgefüllt (Mix2). Nach dem Vermischen beider Proben wurden diese für 15 min bei 37°C inkubiert, bevor durch Zugabe von 500 µL eiskalter Terminations-Lösung die Reaktion abgestoppt wurde. Nach dem Vortexieren wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) pelletiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, das Pellet in 1 mL H₂O resuspendiert und durch erneute Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) pelletiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrittes wurde die pelletierte Aktivkohle in 500 µL H₂O aufgenommen und in ein mit

3,5 mL Szintillations-Flüssigkeit "*Rotiszint Eco Plus*" (Roth, Karlsruhe) gefülltes Szintillations-Röhrchen überführt. Die Zählraten der Proben wurden anschließend unter Verwendung des Szintillations-Zählers "*TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 2100TR*" (Packard Instrument, Meriden, USA) vermessen.

Reaktionsmix	Enzym	200 nM
	Aminosäure	1 mM
	ATP	1 mM
	Na ₄ P ₂ O ₇	50 µM
	MgCl ₂	10 mM
	[³² P]-Na ₄ P ₂ O ₇	0,15 µCi
	Assaypuffer	add. 100 µL
Terminationsmix	Na ₄ P ₂ O ₇	100 mM
	HClO ₄	500 mM
	Aktivkohle (Norit A)	1,2% (w/v)

Als Standard-Puffer für die ATP-PP_i-Austauschreaktion wurde Assay-Puffer verwendet. Um Nebenreaktionen der enthaltenen Protein-Verunreinigungen in der heterogenen Proteinprobe ausschließen zu können, wurde dATP anstelle von ATP verwendet.

Assay-Puffer	HEPES	50 mM, pH 8,0
	NaCl	100 mM

4.3.2 Beladung von NRPSs mit radioaktiv-markierten Aminosäuren

Die kovalente Beladung von NRPS PCP-Domänen mit den Substrataminosäuren kann durch die Inkubation der Enzyme mit radioaktiv-markierten Aminosäuren unter Zugabe von ATP und MgCl₂ analysiert werden. Die anschließende Präzipitation des Proteins mit Trichloressigsäure (TCA) führt zur Ko-Präzipitation der gebundenen Aminosäure, während die freien Aminosäuren im Überstand verbleiben und abgetrennt werden können. Bei der Bestimmung des Blindwertes dieser Reaktion wird auf die Zugabe von ATP verzichtet. Im ersten Ansatz wurde das zu analysierende Enzym mit MgCl₂ vorgelegt und mit Puffer auf 50 µL aufgefüllt (Mix1). Die radioaktiv markierte Aminosäure und ATP wurden im zweiten Ansatz vorgelegt und mit Puffer auf ein Volumen von 50 µL aufgefüllt (Mix2). Nach dem Vermischen bei der Ansätze wurden das Reaktionsgemisch für 15 min bei

37°C inkubiert, bevor durch Zugabe von 800 µL eiskalter, 10%iger TCA-Lösung die Reaktion abgestoppt wurde. Um eine quantitative Fällung der Proteine sicherzustellen, wurden 15 µL BSA-Lösung (25 g/L) zur Ko-Präzipitation hinzu gegeben. Nach ihrem Vortexieren wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert, bevor das Präzipitat durch Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, 4°C) pelletiert wurde. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Pellet vorsichtig mit 800 µL eiskalter, 10%iger TCA-Lösung überschichtet. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt, das Pellet auf analoge Weise ein zweites Mal gewaschen, bevor es in 400 µL Ameisensäure gelöst und in ein Szintillations-Röhrchen mit 3,5 mL Szintillations-Flüssigkeit "*Rotiszint Eco Plus*" (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt wurde. Die Zählraten der Proben wurden anschließend unter Verwendung des Szintillations-Zählers "*TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 2100TR*" (Packard Instrument, Meriden, USA) vermessen. Die prozentuale Beladung des Proteins kann anschließend durch Umrechnung der erhaltenen Zählraten mit der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Aminosäure determiniert werden.

Die spezifischen Aktivitäten der eingesetzten [³H]- und [¹⁴C]-markierten Aminosäuren (*Amersham Biosciences*, Braunschweig) waren: [¹⁴C]-L-Ornithin (243 Ci/mol), [¹⁴C]-L-Prolin (246 Ci/mol), [¹⁴C]-L-Phenylalanin (453 Ci/mol), [³H]-L-Leucin (141 Ci/mmol).

Reaktionsmix	Enzym	500 nM
	[³ H] od. [¹⁴ C] Aminosäure	1-2 mM
	ATP	4 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Assaypuffer	add. 100 µL

4.3.3 Posttranslationale Modifikation *in vitro*

Die Überproduktion rekombinanter NRPS in *E. coli* M15-Zellen erfordert eine nachträgliche *in vitro*-Modifikation der PCP-Domänen mit dem 4'-PPant-Kofaktor, da eine Koexpression des für die PPTase GSP kodierenden Gen *gsp* in diesen Zellen nicht möglich ist. Außerdem kann durch nachträgliche Modifikation *in vitro* das Maß der *in vivo* Modifikation ermittelt werden. Für die *in vitro*-Modifikation wurde die PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis* verwendet [Mofid et al., 1999]. Die zu untersuchenden Enzyme wurden zunächst mit MgCl₂, Coenzym A (CoASH) und Sfp

vermischt, mit Puffer auf 100 μL aufgefüllt und anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Aminosäure und ATP. Nach weiterer Inkubation für 15 min bei 37°C konnte die Probe - in der für Beladungs-Reaktionen beschriebenen Weise - aufgearbeitet werden (siehe Kapitel 4.3.2).

Reaktionsmix	Enzym	500 nM
	Sfp	1 nM
	Coenzym A	100 μM
	[^3H] od. [^{14}C] Aminosäure	1-2 mM
	ATP	4 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Assaypuffer	add. 100 μL

4.3.4 Epimerisierungsassay

Um die Epimerisierungsaktivität der in dieser Arbeit verwendeten Proteine zu untersuchen, wurden die Enzyme analog zur Beladungsreaktion mit radioaktiver Substrataminosäure [^{14}C]-LPhe inkubiert. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 800 μL eiskalter Trichloressigsäure (TCA, 10% (v/v)) gestoppt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets zweimal mit 400 μL TCA gewaschen. Erneute Waschschrte mit 1 mL Diethylether/Ethanol (3:1, v/v) und 1 mL Diethylether entfernten letzte TCA-Reste, welche die nachfolgende alkalische Thioesterspaltung beeinträchtigen würden. Die Pellets wurden mit von 100 μL Kaliumhydroxid (100 mM) für 10 min bei 75°C inkubiert, wodurch die als Thioester gebundenen Aminosäuren abgespalten wurden. Anschließend wurde der Reaktionsmischung 1 mL Methanol zugegeben und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die Pellets wurden in 20 μL Ethanol (50%, v/v) resuspendiert und auf chirale HPTLC-Fertigplatten CHIR (*Merck*, Darmstadt) aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus den Komponenten Acetonitril/Methanol/Wasser im Verhältnis 4:1:1 (v/v). Die Radioaktivität wurde mittels eines zweidimensionalen Radioaktivitätsscanner Rita Star (*Raytest*, Straubenhardt) unter Verwendung der mitgelieferten RITA-Software analysiert und quantifiziert.

4.4 Produktanalytik

4.4.1 Radioaktiver DKP-Bildungsassay

Die Produktbildungsassays wurden in Assaypuffer unter Zugabe von 10 mM MgCl_2 , 5 mM ATP und 2 mM Substrataminosäuren in einem Endvolumen von 1 mL durchgeführt, wobei jedes Enzym in einer Konzentration von 500 nM vorlag. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 100 μL Proben entnommen und zunächst entsprechend der unter Kap. 4.3.2 beschriebenen Vorgehensweise behandelt. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen 1-Butanol/Chloroform (4:1, v/v) extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, 4°C) wurde die organische Phase abgenommen und mit einem Äquivalent 100 mM NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend vollständig in ein Szintillations-Röhrchen mit 3,5 mL Szintillations-Flüssigkeit "*Rotiszint Eco Plus*" (*Roth*, Karlsruhe) überführt. Die Zählraten der Proben wurden anschließend unter Verwendung des Szintillations-Zählers "*TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer 2100TR*" (*Packard Instrument*, Meriden, USA) vermessen.

4.4.2 HPLC-Analytik

Die Produktanalyse und –identifizierung erfolgte mittels HPLC/MS (Series 1100 HPLC-System, *Agilent*, Waldbronn oder Beckmann Coulter System Gold®). Als Säulen wurden eine C18-Reversed-Phase-Säule „C120/3 Nucleosil C18“ (Porengröße 120 Å, Partikelgröße 3 μm), eine C18-Reversed-Phase-Säule „250/3 Nucleosil 120/3 C18“ oder eine C18-Reversed-Phase-Säule „250/3 Nucleodur 120/3 C18“ (*Macherey-Nagel*, Düren) verwendet. Die Massenanalyse erfolgte mit einer ESI-MS-Anlage mit single-Quadrupol Massendetektor.

4.4.2.1 HPLC/MS-Analyse – Dipeptidbildung

Für die HPLC/MS-Analyse wurden in einem 300 µL Maßstab 500 nM des jeweiligen Donorenzyms und 500 nM des Akzeptorenzyms mit ihren in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ in Assay-Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH = 8,0) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM ATP gestartet und zu bestimmten Zeitpunkten durch Zugabe von 150 µL 1-Butanol/Chloroform (4:1, v/v) gestoppt. Nach kurzem Vortexieren wurde die Probe bis zur Trockne in einer Speed-Vac eingedampft und anschließend in einem Volumen von 200 µL, 90% Puffer A (0,05% Ameisensäure/Wasser, v/v) und 10% Puffer B (0,05% Ameisensäure/Methanol, v/v) aufgenommen. 90 µL dieser Lösung wurden daraufhin mit Hilfe einer 250/3-Nucleodur *reversed phase column* (Macherey-Nagel, Düren) unter Verwendung eines HPLC/MS-Systems (Agilent 1100 Series, Hewlett Packard) chromatographisch getrennt. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,3 mL/min durch Anlegen des im folgenden beschriebenen Gradienten.

HPLC-Gradient	0 min	10% Puffer B
	25 min	60% Puffer B
	30 min	100% Puffer B
	35 min	100% Puffer B

4.4.2.2 HPLC/MS-Analyse – *in vivo*-DKP-Produktion

Die generierten Zweiplasmid-Systeme wurden in M9-Minimalmedium plus 0,1% (w/v) Casaminoaciden kultiviert (30°C/250 Upm). Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 2 mL Proben der Zellkultur entnommen, unmittelbar mit 1 mL Butanol/Chloroform (4:1, v/v) extrahiert, die organische Phase in einer Speed-Vac evaporiert und das Pellet in 200 µL 25% (v/v) Methanol resuspendiert. 30 µL der Reaktionslösung werden mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Beckmann Coulter System Gold®, 120/3-Nucleosil-C18 *reversed phase column*, Macherey-Nagel, Düren) mit einer Flussrate von 0,6 mL min⁻¹ unter isochratischen Bedingungen (25% Methanol) analysiert.

4.4.2.3 HPLC/MS-Analyse – DKP-Quantifizierung

Zur Bestimmung der Umsatzraten wurden jeweils 500 nM des Donor- und Akzeptorenzyms in einem Reaktionsvolumen von 1 mL analog zu den unter Kap. 4.3.2.1 beschriebenen Bedingungen behandelt. Aus dem Reaktionsansatz wurden 300 μL Proben zu bestimmten Zeitpunkten entnommen und die Reaktionen mit 150 μL 1-Butanol/Chloroform (4:1; v/v) gestoppt. Die Reaktionsmischungen wurden zur Trockne eingedampft, die Pellets in 100 μL Methanol (25%, v/v) resuspendiert und 30 μL davon mittels RP-HPLC (Beckmann Coulter System Gold®; 120/3-Nucleosil-C18 reversed phase column, *Macherey-Nagel*, Düren) mit einer Flussrate von 0.6 mL min^{-1} unter isochratischen Bedingungen (25% Methanol) analysiert.

5 ERGEBNISSE

Für die reibungslose Synthese eines nichtribosomalen Peptidproduktes ist die spezifische Erkennung und Interaktion der einzelnen Peptidsynthetasen im Verbund des multienzymatischen Biosynthese-Komplexes unerlässlich. Hierbei muss insbesondere sichergestellt werden, dass lediglich Partner-Enzyme in produktive Nachbarschaft zueinander gebracht werden, da eine unspezifische Interaktion zwischen Nichtpartner-Enzymen zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte führen würde. Dies soll am Beispiel des Tyrocidin-Biosynthesesystems verdeutlicht werden:

Das zyklische Dekapeptid Tyrocidin A wird von den drei Synthetasen TycABC, synthetisiert. Nur bei einer Übertragung der Syntheseintermediate zwischen den einzelnen Synthetasen in der Abfolge TycA – TycB – TycC kann das Antibiotikum Tyrocidin A gebildet werden (A). Die direkte Interaktion der Nichtpartner-Enzyme TycA und TycC würde die Bildung eines verkürzten Heptapeptid-Produktes zur Folge haben (B). Die zusätzliche Erkennung einer TycB-Synthetase bei der Synthese der wachsenden Peptidkette würde hingegen ein Tridekapeptid ergeben (C) (Abb. 5.1).

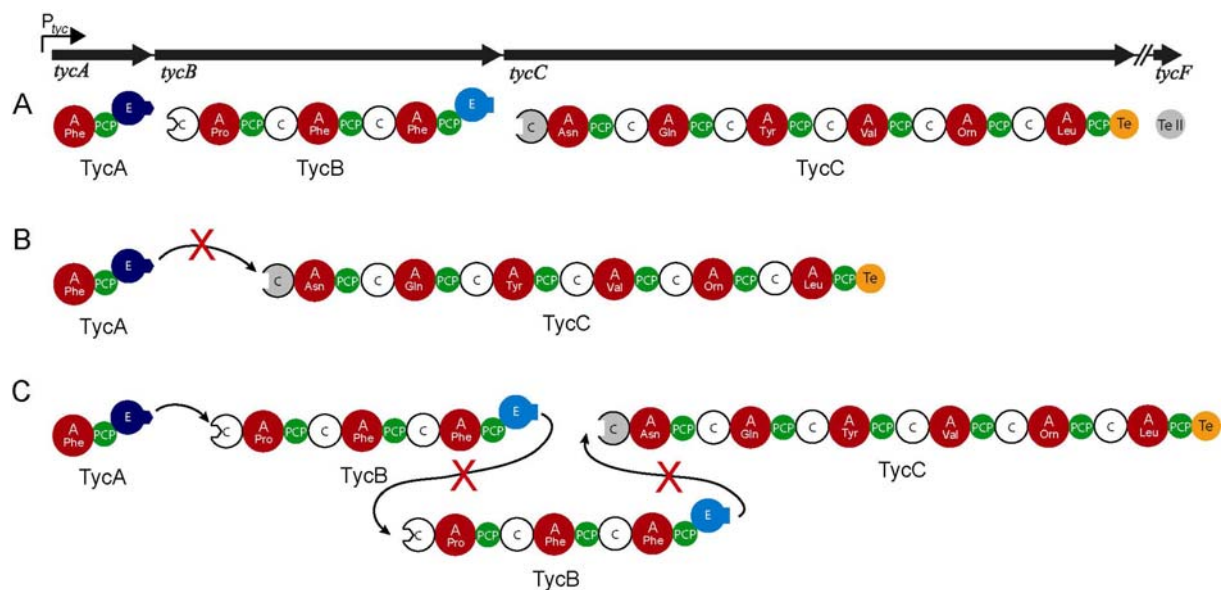


Abb. 5.1: Zusammenspiel der Tyrocidin-Synthetasen TycABC. Dargestellt ist die koordinierte Interaktion der Tyrocidin-Synthetasen TycABC, die an der Bildung des Peptidantibiotikums Tyrocidin A beteiligt sind (A). Mögliche Miss-Interaktionen die zur Bildung eines verkürzten (B) oder verlängerten Peptids (C) führen würden, werden in der Natur nicht beobachtet.

Syntheseprodukte, die aus einer solchen variablen Interaktion der Peptidsynthetasen resultieren, werden in der Natur gewöhnlich nicht beobachtet.

Dies wirft die Frage auf, wie die selektive Erkennung zwischen nichtribosomalen Peptidsynthetasen gesteuert und kontrolliert wird.

Aus Untersuchungen zur Initiationsreaktion des Tyrocidin-Biosynthesesystems war bekannt, dass das Donorenzym TycA (Domänenfolge A-PCP-E) zusammen mit dem Akzeptorenzym TycB1 (Domänenfolge C-A-PCP) zur Bildung des Dipeptids DPhe-LPro-DKP in der Lage ist. Im Gegensatz dazu war eine um die gesamte E-Domäne verkürzte Mutante von TycA (Domänenfolge A-PCP) nicht imstande, mit TycB1 ein entsprechendes Dipeptid zu bilden, unabhängig davon, ob LPhe oder DPhe als Thioester am Ppant-Kofaktor gebunden vorlag [Stachelhaus et al., 1998]. Darüber hinaus konnte durch Mutationsstudien in der E-Domäne des Initiationsenzyms GrsA des Gramacidin S-Biosynthesesystems (Domänenfolge A-PCP-E) gezeigt werden, dass GrsA-Mutanten mit inaktivierten E-Domänen weiterhin in der Lage sind, in Gegenwart von DPhe sowohl die Dipeptid- als auch die DKP-Bildung auszulösen [Stachelhaus und Walsh, 2000]. Der gegenseitige Austausch der kompletten E-Domäne der Donorenzyme TycA und TycB3 (Domänenfolge A-PCP-E) führte dazu, dass das aus Nicht-Partnerenzymen bestehende System $[A-PCP]_{TycA}-[E]_{TycB3}/TycC1$ zur Bildung des Dipeptids DPhe-LAsn in der Lage war, während das System $[A-PCP]_{TycB3}-[E]_{TycA}/TycB1$ DPhe-LPro-DKP produzierte (die Angaben in den Klammern beschreiben die Domänenfolge; die Indizes geben die Herkunft der Domänen an). Hingegen konnte weder im System TycA/TycC1 noch TycB3/TycB1 eine Dipeptidbildung beobachtet werden [Linne und Marahiel, 2000]. Dies führte zu der Theorie, dass der ca. 480 Aminosäuren umfassende C-terminale Bereich der Donorenzyme an einer effizienten intermolekularen Interaktion in NRPSs beteiligt ist.

Unterstützung erhielt diese Theorie durch Untersuchungen in den mechanistisch verwandten Polyketidsynthasen (PKSs). Hier wurde ebenfalls der Einfluss terminaler intermolekularer Bereiche, sogenannter Linker-Regionen, beobachtet, welche wesentlich zur gerichteten Polyketidsynthese beitrugen [Gokhale et al., 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Einfluss der C- und N-Termini von NRPSs auf die Protein-Protein Interaktion untersucht werden.

5.1 Einfluss des C-Terminus von TycA auf die Protein-Protein-Interaktion mit dem Partnerenzym TycB1

Als Modellsystem für die Untersuchung des Einflusses der Termini von NRPSs auf die Kommunikation diene die gut charakterisierte Initiationsreaktion der Tyrocidin-Biosynthese. Frühere Studien belegten, dass die beiden ersten Module des Tyrocidin-Biosynthesystems in der Lage sind, die Bildung des Dipeptids DPhe-LPro-S-Ppant zu katalysieren. Das Donorenzym TycA (Domänenfolge A-PCP-E) aktiviert hierbei die Substrataminosäure Phenylalanin und verknüpft diese mit der vom Akzeptorenzym TycB1 (Domänenfolge C-A-PCP) aktivierten Iminosäure Prolin. In Abwesenheit weiterer Module oder Substrate unterliegt das enzymgebundene Dipeptid einer schnellen Produktfreisetzung unter autokatalytischer Bildung des zyklischen Dipeptids DPhe-LPro-Diketopiperazin (DPhe-LPro-DKP) [Gruenewald et al., 2004] (Abb. 5.2).

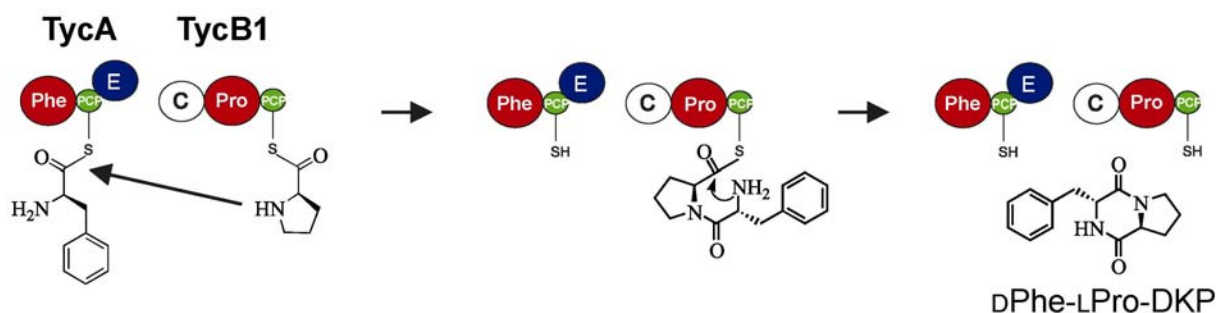


Abb. 5.2: Reaktionsverlauf der DKP-Bildung. Die an den PCPs gebundenen Aminosäuren Phenylalanin und Prolin werden durch einen nukleophilen Angriff der Iminogruppe des Prolins zunächst zum Peptidyl-S-PpantP-Dipeptid verknüpft, ehe es durch erneuten Angriff der Aminogruppe des Phenylalanins zum Ringschluss und zur Abspaltung des zyklischen DPhe-LPro-DKPs kommt.

5.1.1 Konstruktion, Überproduktion und Reinigung C-terminaler Verkürzungsmutanten von TycA

Der Einfluss des C-Terminus des Donorenzyms TycA auf die Protein-Protein-Interaktion im Modellsystem TycA/TycB1 sollte in *in vitro* und *in vivo* Studien getestet werden. Dazu wurden in dieser Arbeit zunächst sechs Verkürzungsmutanten des Donorenzyms TycA hergestellt, die am C-Terminus um 3-23 Aminosäuren gegenüber dem natürlichen Modul TycA verkürzt waren.

Die für die sechs Verkürzungsmutanten, TycA Δ 03, TycA Δ 06, TycA Δ 09, TycA Δ 12, TycA Δ 15 und TycA Δ 23 sowie das natürliche Enzym TycA kodierenden Genfragmente konnten mittels PCR aus chromosomaler DNA des Tyrocidin Produzentenstammes *B. brevis* ATCC 8185 amplifiziert und anschließend in den pTrcHis-TOPO Vektor insertiert werden.

Die Produktion der rekombinanten Enzyme erfolgte heterolog in *E. coli* M15(pRep4). Durch anschließende Ni²⁺-Affinitätschromatographie konnten alle Proteine annähernd zur Homogenität gereinigt werden (Abb. 5.3).

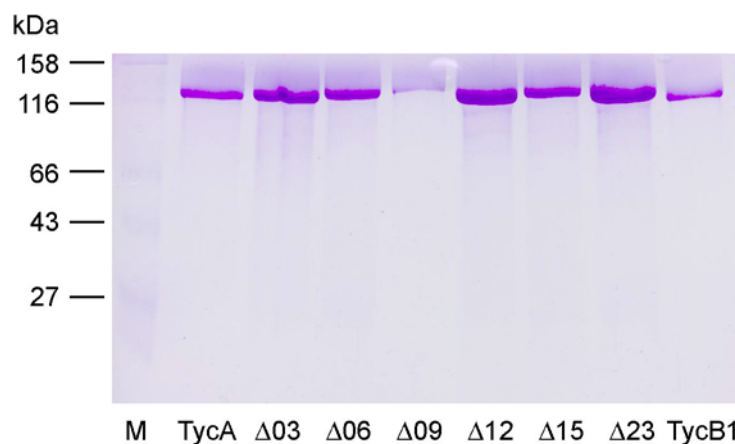


Abb. 5.3: SDS-PAGE-Analyse der Proteinreinigung der natürlichen Enzyme TycA und TycB1 sowie der Verkürzungsmutanten TycA Δ 03-23.

5.1.2 Biochemische Analyse der C-terminalen Verkürzungsmutanten

Die Grundvoraussetzung für die Bildung des erwarteten Dipeptids ist die katalytische Aktivität der einzelnen Domänen der beteiligten Enzyme. Diese müssen in der Lage sein a) die Substratamino­säure zu aktivieren und b) als Thioester an den 4'-Ppant-Kofaktor kovalent zu binden. Alle Verkürzungsmutanten sowie die natürlichen Konstrukte TycA und TycB1 wurden dahingehend getestet.

5.1.2.1 Die ATP-PP_i-Austauschreaktion

Die Aktivität der für die Substraterkennung und –aktivierung verantwortlichen A-Domänen wurde mittels ATP-PP_i-Austauschreaktion gemäß der unter Kap. 4.3.1 beschriebenen Angaben untersucht. Getestet wurden die kognaten

Substrataminosäuren der A-Domänen; auf die Bestimmung eventuell vorhandener Nebenspezifitäten wurde verzichtet.

Alle sechs Verkürzungsmutanten und das Wildtyp-Enzym TycA wurden einer LPhe-abhängigen ATP-PP_i-Austauschreaktion unterzogen. Die Aktivität aller Mutanten lag auf dem Niveau des Wildtyps (zwischen 90-98%), dessen Aktivität gleich 100% gesetzt wurde. Auch das Akzeptormodul TycB1 wurde auf seine Adenylierungsaktivität getestet, und zeigte in Gegenwart von LPro die erwartete Aktivität (Abb. 5.4).

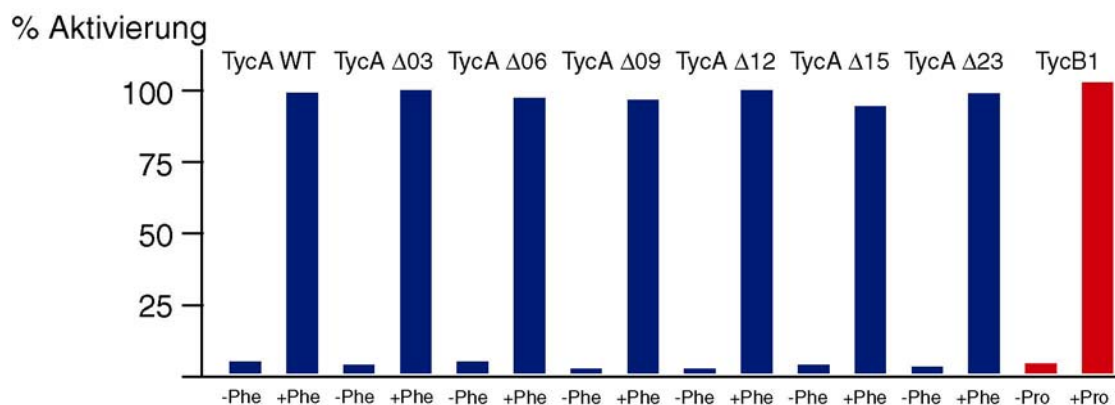


Abb. 5.4: Ergebnis der ATP-PP_i-Austauschreaktion für die Verkürzungsmutanten, TycA und TycB1. Alle Enzyme zeigen die erwartete Aktivität bezüglich ihrer Substrataminosäure (die höchste Inkorporation von [³²P]-PP_i in ATP wurde gleich 100% gesetzt).

5.1.2.2 In vitro-Modifikation und Beladungsreaktion

Die Modifikation der Enzyme mit CoA und anschließende kovalente Bindung des aktivierten Substrates erfolgte wie in Kap. 4.3.2 beschrieben. In Abhängigkeit von ATP konnten die Verkürzungsmutanten, das native TycA und TycB1 die radioaktiv markierten Substrataminosäuren [¹⁴C]-LPhe oder [¹⁴C]-LPro aktivieren und kovalent binden. Unabhängig von der Länge der Verkürzung wurden die Mutanten zu 22-35% beladen. Damit liegen sie im Rahmen dessen, was man für das natürliche Enzym TycA (28%) beobachtete. Für das Akzeptormodul TycB1 wurde eine Beladung von 54% beobachtet (Abb. 5.5).

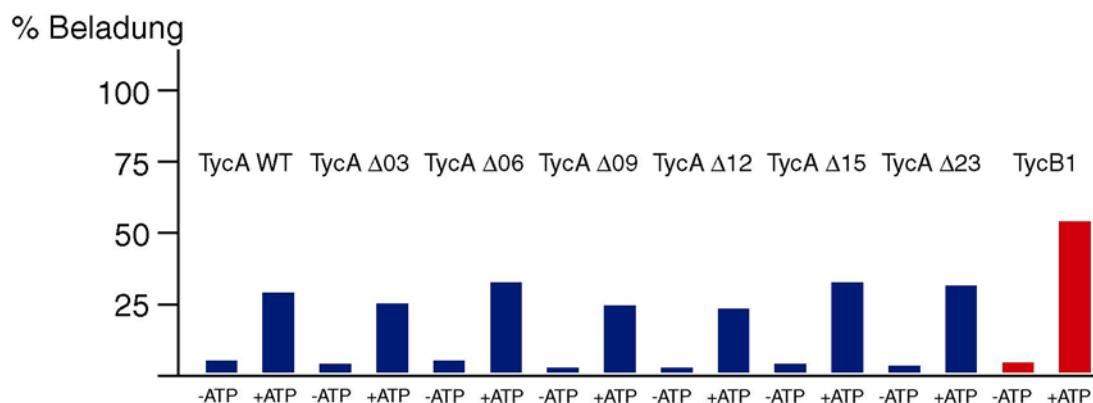


Abb. 5.5: Auswertung der Beladungsreaktion der Verkürzungsmutanten, TycA und TycB1. Alle Donormodule zeigen vergleichbare Beladungswerte für die Substrataminosäure L¹⁴Phe (22-34%). Das Akzeptormodul TycB1 wird mit L¹⁴Pro zu 54% beladen.

Die Auswertung der ATP-PP_i-Austauschreaktion und der Beladungsreaktion zeigte, dass alle sechs getesteten Verkürzungsmutanten im Vergleich zum Wildtyp Enzym TycA ihre volle Aktivität bewahren konnten. Ebenso zeigte das Protein TycB1 die erwartete Aktivität hinsichtlich Substrataktivierung und -bindung.

5.1.3 Elongationsaktivität und Dipeptidbildung

Nachdem die Grundaktivitäten der beteiligten Enzyme durch ATP-PP_i-Austausch und Beladungsreaktion verifiziert wurden, sollte nachfolgend die Produktbildungsaktivität von Systemen mit C-terminal verkürzten Donor-Modulen untersucht werden. In Anlehnung an die in früheren Arbeiten etablierte Versuchsvorschrift wurden die jeweiligen TycA-Donorenzyme (Wildtyp oder Verkürzungsmutante) hierzu mit ATP und radioaktivem [¹⁴C]-L¹⁴Phe präinkubiert, um die Bildung der korrespondierenden [¹⁴C]-D¹⁴Phe-S-Ppant-Thioester-Intermediate zu ermöglichen. Nachfolgend wurden die Enzyme mit äquimolaren Mengen des beladenen Akzeptormoduls Prolyl-S-Ppant-TycB1 vereinigt. Unter diesen Reaktionsbedingungen wird der D¹⁴Phe-Rest vom Donorenzym auf das Akzeptorenzym TycB1 übertragen, wodurch es zur Bildung des D¹⁴[¹⁴C]Phe-L¹⁴Pro-S-Ppant-Dipeptidyl-Intermediates kommt. Diese Reaktion wird von einer schnellen Neubeladung von TycA mit [¹⁴C]-L¹⁴Phe und der langsamen autokatalytischen Freisetzung des [¹⁴C]-D¹⁴Phe-L¹⁴Pro-DKP Produktes begleitet. Damit kann eine stattfindende Elongation durch den Anstieg der TCA-präzipitierten Radioaktivität, der für eine gleichzeitige Bindung von markiertem [¹⁴C]-L¹⁴Phe am Donor ([¹⁴C]-D¹⁴Phe-S-Ppant-TycA) und Akzeptor ([¹⁴C]-D¹⁴Phe-L¹⁴Pro-S-Ppant-TycB1) erwartet wird,

nachgewiesen werden (Abb. 5.6 A). Ebenso lässt sich die DKP-Bildung nach organischer Extraktion durch Anreicherung des radioaktiv markiertem $D[^{14}C]$ Phe-LPro-DKP Produktes in der organischen Phase nachweisen (Abb. 5.6 B).

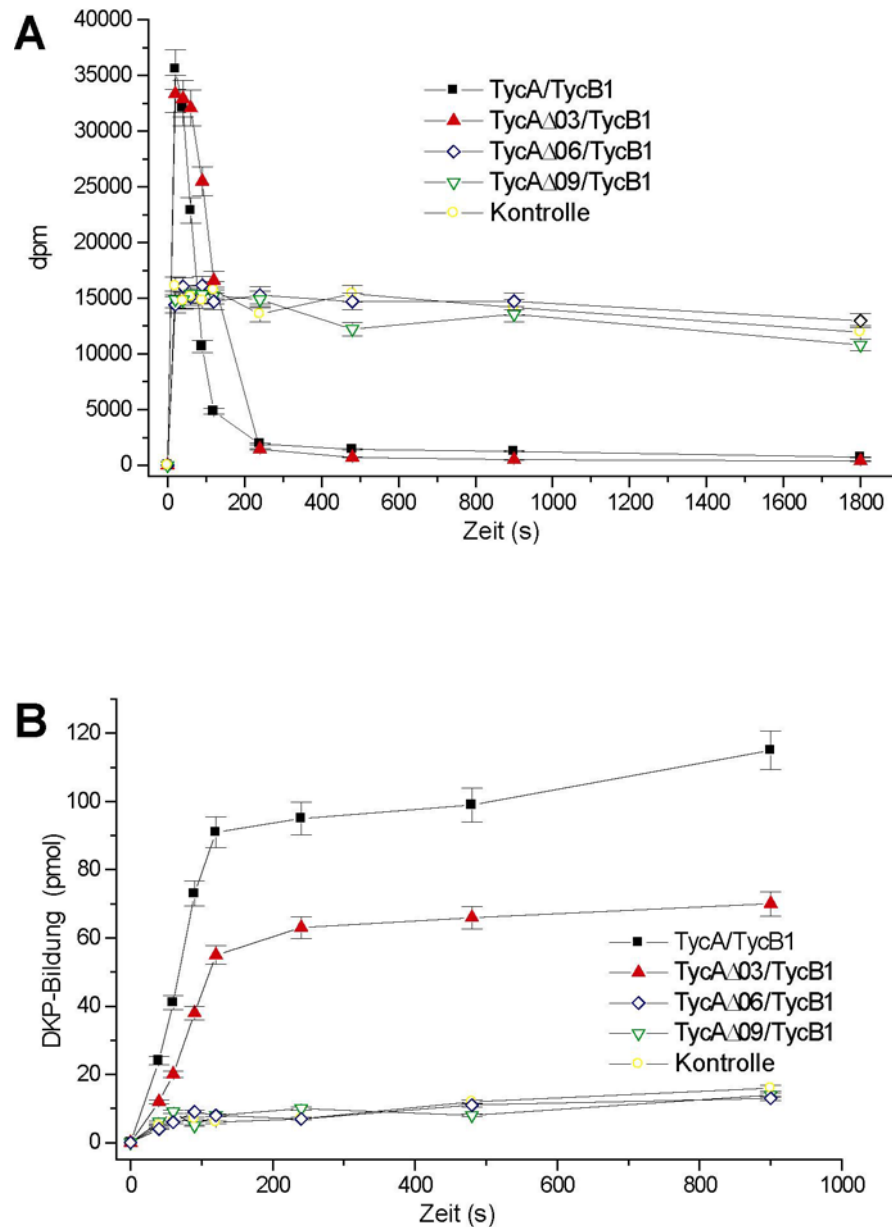


Abb. 5.6: Untersuchung der Elongationsaktivität der Synthetasenpaare aus den C-terminalen TycA-Verkürzungsmutanten und TycB1 (A). Die Elongationsaktivität der C-terminalen TycA-Verkürzungsmutanten wurde in Gegenwart des Partner-Akzeptor-Moduls TycB1 durch Bestimmung der enzymgebundenen, säurestabilen Beladung mit radioaktiver Substrataminosäure getestet ($[^{14}C]$ -D-Phe-S-Pant-TycA und $[^{14}C]$ -D-Phe-LPro-S-Pant-TycB1)). **Untersuchung der DKP-Bildung (B).** Die DKP-Bildung wurde nach organischer Extraktion durch die Anreicherung von radioaktiv markiertem $[^{14}C]$ -D-Phe-LPro-DKP in der organischen Phase bestimmt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Ergebnisse der Systeme TycA Δ 12-23/TycB1 verzichtet. Diese zeigten jedoch den gleichen Reaktionsverlauf wie die Kontrollreaktion in der die Substrataminosäure LPro fehlte.

Wie in (Abb. 5.6 A) zu sehen ist, erfolgt eine Elongationsreaktion in Gegenwart von Wildtyp TycA und der Verkürzungsmutante TycA Δ 03, was durch den Anstieg der säurestabil gebundenen radioaktiv markierten Aminosäure belegt wird. Der anschließend beobachtete schnelle Abfall der Radioaktivität lässt sich durch den geringen stöchiometrischen Überschuss an eingesetzter Donoraminosäure [^{14}C]-LPhe und der autokatalytischen Freisetzung des [^{14}C]-DPhe-LPro-DKPs (vgl. Abb. 5.6 B) erklären.

Es konnte gezeigt werden, dass schon das TycA Δ 03/TycB1-System hinsichtlich einer DKP-Bildung eingeschränkt ist, was sich in einer geringfügig niedrigeren Produktbildungsrate im Vergleich zum Wildtyp-System TycA/TycB1 widerspiegelt (Wildtyp: $k_{\text{obs}} = 0,94 \text{ min}^{-1}$, TycA Δ 03: $k_{\text{obs}} = 0,54 \text{ min}^{-1}$). Im Falle der anderen Verkürzungsmutanten TycA Δ 06 und TycA Δ 09 konnte weder ein Transfer von [^{14}C]-DPhe vom Initiations- zum Elongationsmodul noch eine DKP-Bildung beobachtet werden. Der Reaktionsverlauf entsprach dabei dem der Kontrollreaktion, in der die Substrataminosäure LPro fehlte und es somit nicht zur Übertragung des [^{14}C]-DPhe kommen konnte. Auch für die Mutanten TycA Δ 12, TycA Δ 15 und TycA Δ 23 konnte weder eine Elongationsreaktion noch eine DKP-Bildung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.4 Einfluss C-terminaler Verkürzungsmutanten auf die Epimerisierungsaktivität

Die fehlende Produktbildung von DPhe-LPro-DKP in den Systemen der Verkürzungsmutanten (TycA Δ 06-TycA Δ 23) kann entweder durch den Verlust der Protein-Protein Kommunikation zwischen den beiden Partner-NRPSs oder durch die Inaktivität der E-Domänen der Initiationsmodule als Folge der Deletion der C-terminalen Aminosäurereste erklärt werden. Bemerkenswerterweise akzeptiert und prozessiert die C-Domäne des Akzeptormoduls TycB1 ausschließlich D-konfigurierte Donoraminosäuren, was auf die allgemein in C-Domänen vorhandene Substratselektivität zurückzuführen ist [Belshaw et al., 1998]. TycA-Mutanten mit einer inaktiven E-Domäne sind dagegen in der Lage, im Zusammenspiel mit TycB1-Synthetasen die Dipeptid- und DKP-Bildung auszulösen, sofern ihnen DPhe als Substrataminosäure zur Verfügung steht [Stachelhaus und Walsh, 2000].

Zur Aufklärung der Ursachen für die ausbleibende Produktbildung in den Systemen mit den TycA-Donor-Mutanten $\Delta 06$ - $\Delta 23$ -Mutanten wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt. Zunächst wurde die Epimerisierungsaktivität des Wildtyp-Enzyms TycA und der Verkürzungsmutanten getestet. Hierzu wurden die Donor-Module mit ihrer Substrataminosäure [14 C]-LPhe beladen, die gebildeten Phe-S-Ppant Thioester alkalisch gespalten und die Stereochemie der Spaltprodukte nachfolgend mittels chiraler Dünnschichtchromatographie analysiert. Diese Untersuchungen ergaben, dass alle Mutanten in der Lage waren, das angebotene Substrat [14 C]-LPhe vollständig in [14 C]-DPhe umzuwandeln. Ein D-zu-L-Verhältnis von 2:1, wie es bei Untersuchungen der E-Domäne des verwandten Initiationsmoduls GrsA des Gramicidin-Biosynthesesystems detektiert wurde, konnte hier nicht beobachtet werden [Stachelhaus und Walsh, 2000; Luo und Walsh, 2001] (Abb. 5.7).

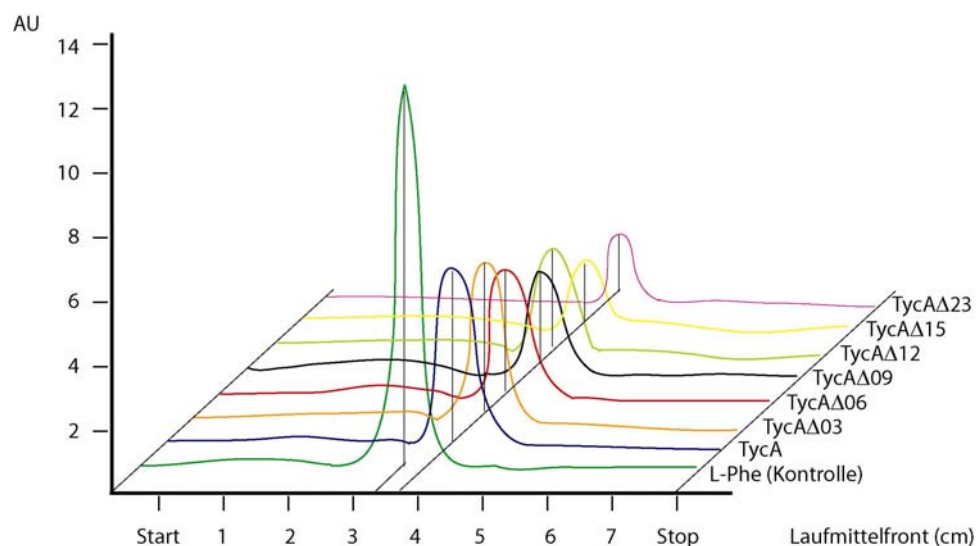


Abb. 5.7: Radioaktive TLC-Analyse zur E-Domänenaktivität der TycA-Verkürzungsmutanten. Sämtliche Deletionsmutanten wurden auf ihre Fähigkeit LPhe zu DPhe zu konvertieren getestet und waren in ihrer Epimerisierungsaktivität im Vergleich zum Wildtyp Enzym TycA nicht beeinflusst. Als Kontrolle wurde [14 C]-LPhe eingesetzt.

Darüber hinaus wurden die Elongations- und die Produktbildungsreaktionen unter leicht modifizierten Bedingungen wiederholt. Dieses Mal wurde markiertes [14 C]-LPro eingesetzt und die Reaktion in Gegenwart von nichtmarkierten Substraten LPhe und DPhe durchgeführt. Wäre infolge der Deletionen die E-Domänenaktivität beeinträchtigt worden aber die Kommunikation intakt geblieben, so wäre in Gegenwart von DPhe zunächst eine Translokation und anschließend die Bildung von DPhe-[14 C]-LPro-DKP erfolgt. Aufgrund der C-Domänenselektivität von TycB1 ist

dagegen eine Translokation trotz intakter Interaktion in Gegenwart von LPhe nicht möglich. Das Ergebnis zeigte jedoch eindeutig, dass die Produktbildung in allen getesteten Systemen unabhängig von der Konfiguration der eingesetzten Donoraminosäure war. So bildeten wiederum nur die Systeme TycA/TycB1 und TycA Δ 03/TycB1 das erwartete Produkt DPhe-LPro-DKP, unabhängig davon ob LPhe oder DPhe als Substrat des Donorenzyms eingesetzt wurde (Abb. 5.8).

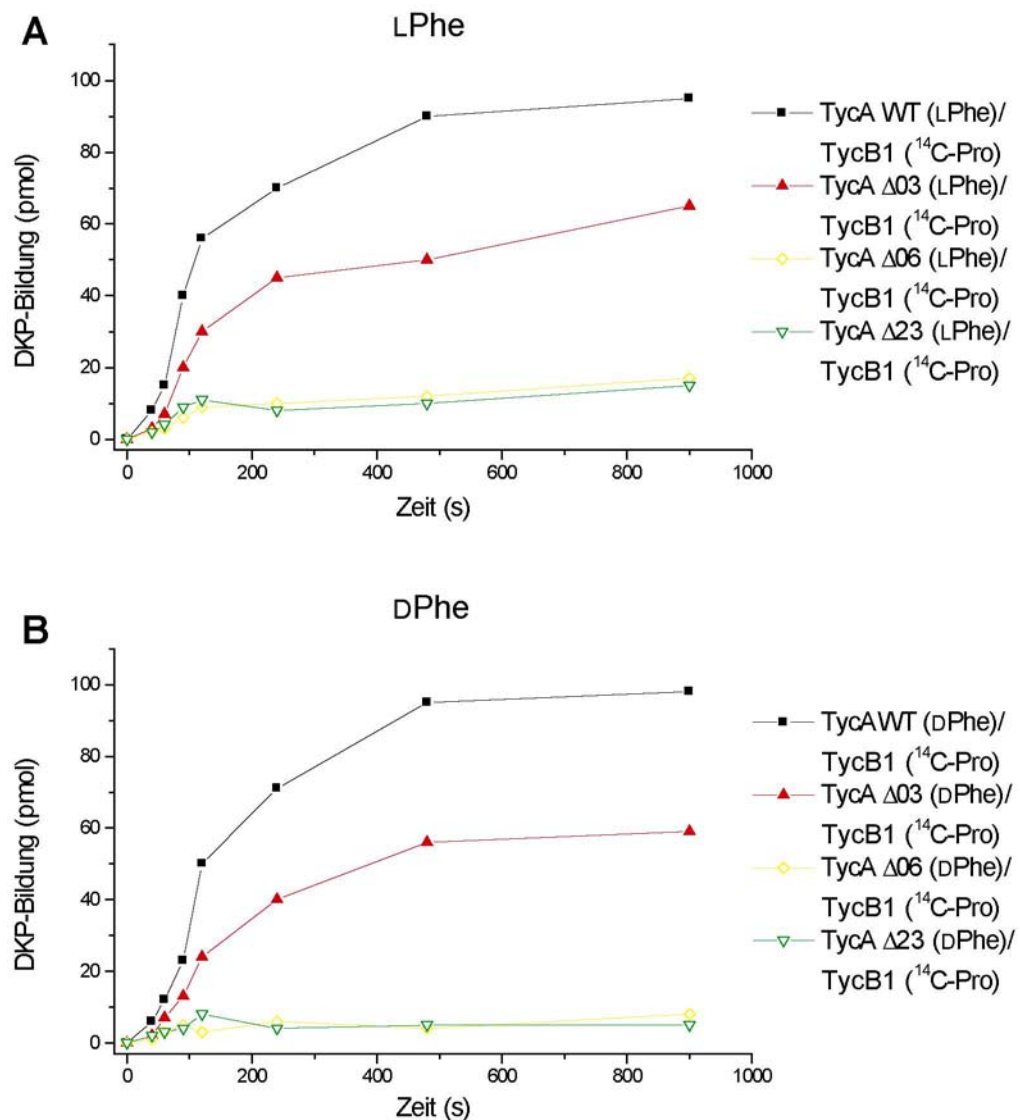


Abb. 5.8: Kontrolle der E-Domänenaktivität der TycA-Verkürzungsmutanten. Für alle Deletionsmutanten (TycA/TycA Δ 03-23) wurde ein DKP-Bildungsassay in Gegenwart der Substrat-Aminosäuren LPhe (**A**) bzw. DPhe (**B**) und radioaktiv markiertem [¹⁴C]-LPro (TycB1) durchgeführt. Die Ergebnisse belegen, dass die E-Domänenaktivität nicht durch die C-terminalen Deletionen beeinflusst wird und dass daher ein Ausbleiben der DKP-Bildung für TycA Δ 06-23 auf fehlende Kommunikation zwischen Donorenzym (TycA-Derivat) und Akzeptorenzym TycB1 zurückzuführen ist. Auch in Gegenwart von DPhe, erfolgt mit diesen Konstrukten keine DKP-Bildung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Kurvenverläufe für TycA Δ 09-15 verzichtet. Sie zeigen jedoch analoges Verhalten zu TycA Δ 06 bzw. TycA Δ 23.

Diese Tests mit markiertem [^{14}C]-LPro belegten, dass die Aktivität der E-Domäne in keinem der untersuchten Donorenzyme (Wildtyp oder Verkürzungsmutante) beeinträchtigt war. Die bereits im Kapitel 5.1.3. beobachtete Beeinträchtigung der Produktivität des Deletionssystems TycA Δ 03/TycB1 konnte ebenso bestätigt werden, wie die ausbleibende Produktbildung in Gegenwart der Verkürzungsmutanten TycA Δ 06-23.

5.1.5. *in vivo* Untersuchung C-terminaler Verkürzungsmutanten von TycA im Zweiplasmidsystem

Zur Überprüfung, dass das Ausbleiben der Protein-Protein Kommunikation zwischen TycA-Verkürzungsmutanten und TycB1 nicht auf einen Artefakt zurückzuführen ist, der durch die Reaktionsbedingungen in den *in vitro* Untersuchungen ausgelöst wurde, wurde der Einfluss der C-terminalen Verkürzungsmutanten auf die DKP-Bildung *in vivo* getestet. Dabei wurde auf ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes System zurückgegriffen, das aus einem Satz von zwei kompatiblen Plasmiden besteht, welche die entsprechenden Genfragmente für die Synthetasen tragen und im selben heterologen Wirt *E. coli* HM0079 koexistieren [Gruenewald et al.; 2004].

Aus früheren *in vitro* Studien im System TycA/TycB1 war bekannt, dass die DKP-Bildung am effizientesten für ein Donor/Akzeptorverhältnis von 1:25 erfolgt. Durch die Wahl des medium-copy Vektors pSU18 als Träger der für die Donorenzyme kodierenden Gene und des high-copy Vektors pTrc99a, welcher das Gen für das Akzeptorenzym TycB1 enthält, kann dieses Verhältnis auch annähernd *in vivo* erreicht werden [Gruenewald et al.; 2004]. Während das Plasmid pTrc99a-*tycB1* bereits vorlag, mussten die kodierenden Genabschnitte von TycA sowie der Verkürzungsmutanten in den Vektor pSU18 kloniert werden. Die sieben Zweiplasmid-Systeme wurden anschließend durch gleichzeitige Transformation von *E. coli* HM0079 mit pTrc99a-*tycB1* und einem entsprechenden pSU18-*tycA* Derivat erhalten.

Die verschiedenen Stämme wurden in M9-Minimalmedium unter Zugabe von 0,1% Casaminoaciden kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, aufgearbeitet und mittels HPLC/MS analysiert (vgl. Kap. 4.4.2.2). Über einen Zeitraum von 48 Stunden waren nur die Systeme pSU18-*tycA*/pTrc99a-*tycB1* und pSU18-*tycA* Δ 03/pTrc99a-*tycB1* in denen die Synthetase-Kombinationen TycA-

TycB1 bzw. TycA Δ 03-TycB1 vorlagen in der Lage, DKP zu bilden, wobei das Mutantensystem etwa 65% der DKP-Menge des Wildtyp-Systems produziert. Dagegen waren Stämme, in denen die Initiationsmodule mit um sechs oder mehr Aminosäuren verkürzten C-Terminus produziert wurden, außerstande, das DKP-Produkt zu bilden (Abb. 5.9). Somit bestätigten die Ergebnisse eindeutig die Resultate der *in vitro* Experimente.

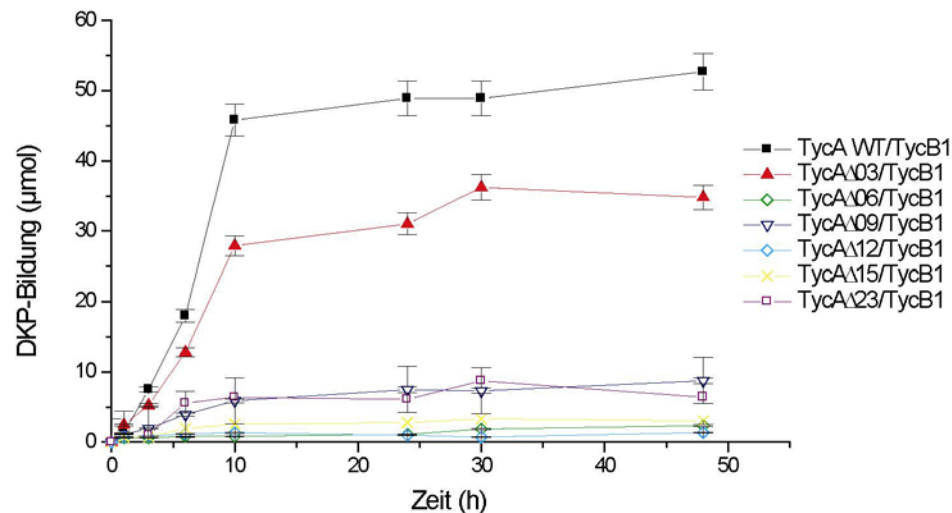


Abb. 5.9: *in vivo* DKP-Bildung unter Verwendung von Zweiplasmid-Systemen. Die Stämme mit den Zweiplasmid-Systemen der Form pSU18-*tycA* bzw. pSU18-*tycA* Δ 03-23/pTrc99a-*tycB1* wurden auf ihre Fähigkeit zur DKP-Bildung *in vivo* untersucht. Dargestellt ist die DKP-Bildung über einen Zeitraum von 48 h. *in vivo* sind nur die Systeme TycAWT/TycB1 bzw. in reduziertem Maße TycA Δ 03/TycB1 zur DKP-Bildung befähigt. Die Systeme TycA Δ 06-23/TycB1 sind dagegen nicht in der Lage, DKP zu bilden.

5.1.6 Einfluss des C-Terminus auf die Interaktion im System TycA/TycB1

Die Ergebnisse der Untersuchung der TycA-Verkürzungsmutanten zeigten, dass die Translokation von DPhe bereits durch die Deletion der sechs C-terminalen Reste von TycA vollständig unterbunden wird. Dagegen wird die Aktivität der C-terminalen TycA-E-Domäne selbst durch die Deletion von 23 Aminosäuren nicht beeinträchtigt. Demzufolge besitzen die C-terminalen Reste (ca. 25) von TycA lediglich eine kommunikations-vermittelnde Aktivität und sollen im Folgenden als kommunikations-vermittelnde (COM)-Domäne bezeichnet werden.

5.2 Charakterisierung und Untersuchung der Kommunikation vermittelnden Domänen (COM-Domänen)

Aufgrund von Sequenzvergleichen zwischen E-Domänen aus verschiedenen Biosynthesessystemen können nur für die ersten 430 der insgesamt 450 Aminosäuren umfassenden E-Domänen größere Homologien und konservierte Bereiche beobachtet werden, während die restlichen C-terminalen 20-30 Aminosäurereste nur geringe Homologien untereinander aufweisen. Die Untersuchung C-terminaler Verkürzungsmutanten bestätigte die Theorie, dass eben dieser C-terminale Bereich im Donorenzym TycA für die intermolekulare Interaktion mit TycB1 von Bedeutung ist. Obwohl in allen getesteten Systemen Donorenzyme mit aktiven E-Domänen vorlagen, führte die Deletion von bereits sechs Aminosäureresten zur Inhibierung der Produktbildung in den entsprechenden Systemen.

Analoge Sequenzstudien für C-Domänen der entsprechenden Akzeptorenzyme zeigten einen ähnlichen Sachverhalt. So weisen die ersten 15-20 Aminosäurereste der N-Termini nur eine geringe Homologie auf, während für die weiteren etwa 430 Aminosäuren der C-Domänen große Homologien und konservierte Motive beobachtet werden können. Es lag daher der Schluss nahe, dass der nur schwach konservierte N-Terminus der C-Domänen ebenfalls an der *in trans* Kommunikation zwischen zwei Synthetasen beteiligt ist.

Aus diesem Grund wurden die terminalen putativen Interaktionsbereiche als Kommunikation-vermittelnde (COM)-Domänen (COM = communication mediating) bezeichnet. (Abb. 5.10).

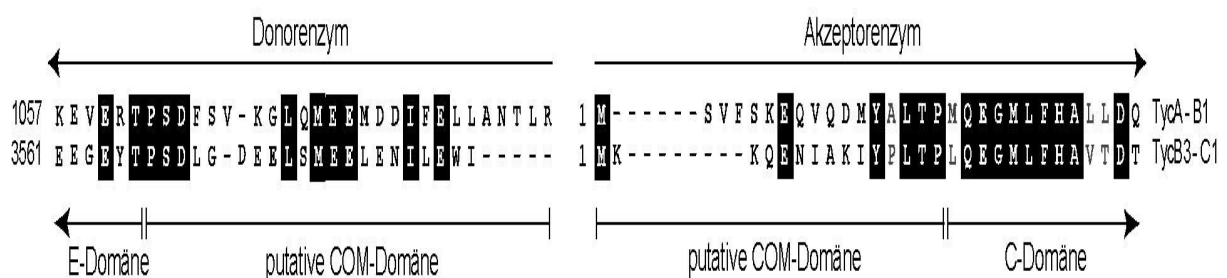


Abb. 5.10: Sequenz-Alignment zur Lokalisierung von Kommunikations-vermittelnden (COM)-Domänen im Tyrocidin-Biosynthesesystem. Dargestellt ist der Übergang zwischen TycA und TycB1 bzw. TycB3 und TycC1 wobei nur jeweils die C-terminalen Aminosäurereste der Donorenzyme und die N-terminalen Aminosäure-Reste der korrespondierenden Akzeptorenzyme gezeigt sind. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Die Lokalisierung der putativen COM-Domänen ist gekennzeichnet.

Eine Untersuchung des N-Terminus von TycB1 hinsichtlich seines Einflusses auf die intermolekulare Kommunikation zwischen den Synthetasen TycA und TycB1 konnte nicht unter analoger Reaktionsführung wie für den C-Terminus von TycA erfolgen, da keine biochemische Methode zur Verfügung steht, die Aktivität der C-Domäne direkt zu testen. Bei der Untersuchung von N-terminalen TycB1-Verkürzungs-Mutanten könnte daher keine Aussage getroffen werden, ob ein Ausbleiben der DKP-Bildung auf fehlende Kommunikation zwischen den Partner-NRPS oder eine Inaktivierung der beteiligten TycB1 C-Domäne zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde ein alternativer experimenteller Ansatz verfolgt, bei dem der Einfluss der postulierten COM-Domänen auf die Protein-Protein-Kommunikation durch den Austausch dieser N- bzw. C-terminalen Aminosäure-Bereiche zwischen Partner- und Nichtpartner-NRPSs untersucht werden sollte.

Als Modellsystem wurde wiederum das Tyrocidin-Biosynthesesystem verwendet, welches am Übergang der Synthetasen, zwischen TycA und TycB1 bzw. TycB3 und TycC1, zwei Partner-COM-Domänenpaare besitzt (Abb. 5.11).

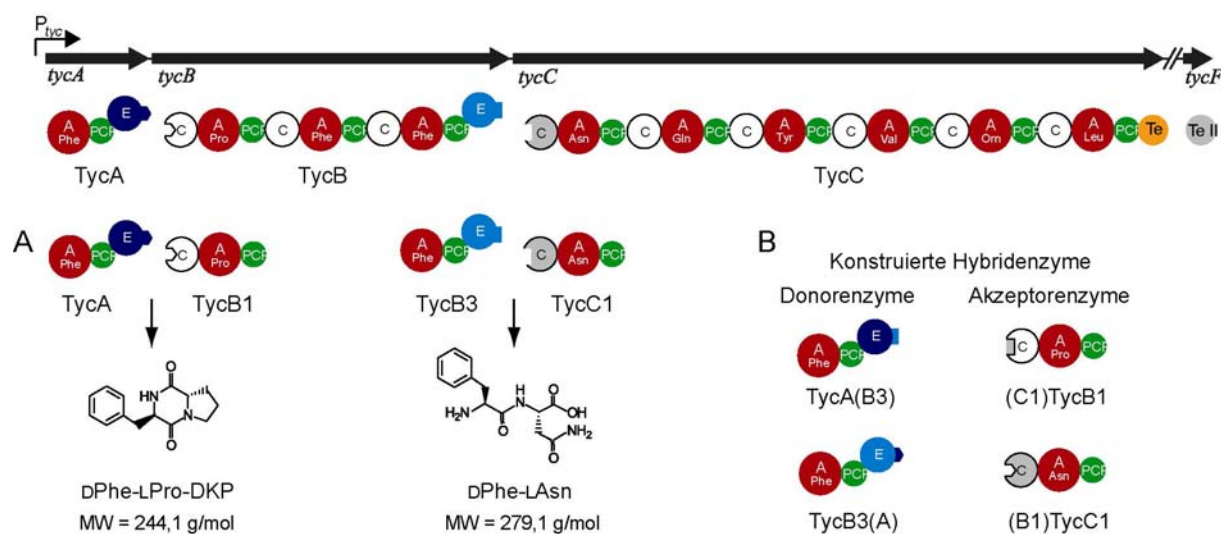


Abb. 5.11: Kommunikation im Tyrocidin-System. Gezeigt sind die artifiziiellen Systeme, mit denen die Kommunikation am Übergang zwischen TycA und TycB (TycA/TycB1), bzw. TycB und TycC (TycB3/TycC1) untersucht werden sollen (A). Der Einfluß der Termini sollte durch Untersuchung der konstruierten Hybridenzyme TycA(B3), TycB3(A), (C1)TycB1 und (B1)TycC1 bestimmt werden. In Klammern ist jeweils der Ursprung des Terminus angegeben (B).

Aus früheren Studien war bekannt, dass es zu keiner Interaktion zwischen den Nichtpartner-NRPS TycA und TycC1 bzw. TycB3 und TycB1 kommt [Linne et al., 2001]. Zur Bestätigung des Modells der interagierenden COM-Domänenpaare sollten ausgehend vom Tyrocidin-System vier hybride NRPS konstruiert werden, in denen

putative COM-Domänen ausgetauscht wurden. So sollten durch artifizielle Fusionen die COM-Domänenbereiche von TycA und TycB1 gegen die entsprechenden COM-Domänen von TycB3 bzw. TycC1 ausgetauscht werden.

Zur Identifizierung der putativen COM-Domänen sowie möglicher Fusionsstellen wurden Sequenzvergleiche mehrerer Übergänge zwischen NRPSs aus verschiedenen Biosynthesystemen herangezogen.

Diese ergaben hochkonservierte Sequenzmotive in unmittelbarer Nähe der Termini sowohl von Donor- als auch Akzeptorenzymen, während im Bereich der COM-Domänen nur geringe Übereinstimmungen beobachtet wurden. Etwa zwanzig Aminosäuren vor dem C-Terminus der Donorenzyme wurde das hochkonservierte Motiv TPSD innerhalb der E-Domäne identifiziert und als Fusionsstelle zwischen E-Domäne und COM-Domäne (COM^D) gewählt. Ähnlich verfahren wurde bei den Akzeptorenzymen. Dort wurde etwa 15 Aminosäuren hinter dem N-Terminus das konservierte Motiv L(T/S)P(M/L)QEG identifiziert und als Fusionsstelle zwischen N-terminaler COM-Domäne (COM^A) und C-Domäne gewählt. Die genauen Fusionsstellen sind unterstrichen (Abb. 5.12).

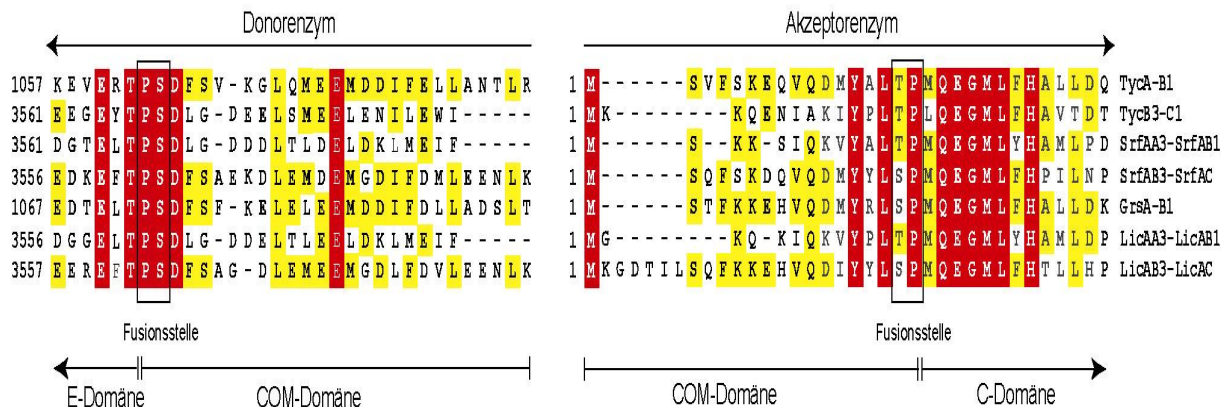


Abb. 5.12: Sequenz-Alignment zur Lokalisierung von Kommunikations-vermittelnden (COM)-Domänen. Es sind exemplarisch die Sequenz-Vergleiche der E/C-Domänen-Übergänge von sieben Partner-Enzymen aus vier unterschiedlichen Biosystemen (Tyrocidin A, Surfactin, Gramicidin S und Lichenysin) gezeigt. Jeweils die C-terminalen Aminosäurereste der Donorenzyme und die N-terminalen Aminosäure-Reste der korrespondierenden Akzeptorenzyme sind gezeigt. Invariante Aminosäurereste sind durch rote Boxen markiert, konservierte Aminosäuren sind gelb hervorgehoben. Die Lokalisierung der C- und N-terminalen COM-Domänen ist gekennzeichnet.

Das natürliche Donorenzym TycB3 (Domänenfolge A-PCP-E) sowie das Akzeptorenzym TycC1 (Domänenfolge C-A-PCP) wurden analog den Verkürzungsmutanten generiert. Basierend auf der Lokalisation der COM-Domänen wurden vier hybride NRPSs konstruiert: die beiden Donormodule TycA(B3) und TycB3(A) mit der

Domänenfolge A-PCP-E-(COM^D), sowie die entsprechenden artifiziellen Akzeptorenzyme (C1)TycB1 bzw. (B1)TycC1 mit der Domänenfolge (COM^A)-C-A-PCP. In Klammern ist jeweils der Ursprung des Terminus angegeben. Aufgrund der zur Konstruktion der Plasmide verwendeten SOE-Methode (*gene splicing by overlapping extension*) [Horton et al., 1989] konnten die Fusionen durchgeführt werden, ohne dass es zu Veränderungen der Aminosäuresequenz an der Fusionsstelle kam. Die so hergestellten kodierenden Genfragmente der artifiziellen Donorenzyme TycA(B3) und TycB3(A) wurden in den pTrcHis-TOPO Vektor kloniert, während Genfragmente der artifiziellen Akzeptorenzyme (C1)TycB1 und (B1)TycC1 in den pTrcHis2-TOPO Vektor inseriert wurden.

Die Herstellung von Produktionsstämmen der artifiziellen Donor- und Akzeptorenzyme erfolgte durch Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* M15(pRep4)-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden. Auf diese Weise konnten die rekombinanten Genprodukte TycA(B3), TycB3(A), TycB3, (C1)TycB1 und (B1)TycC1 heterolog überproduziert und unter Ausnutzung des Hexahistidintags durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Die Funktionalität der A-Domänen in den artifiziellen Enzymen TycA(B3), TycB3(A), (C1)TycB1 und (B1)TycC1, sowie den natürlichen Enzymen TycB3 und TycC1 wurde durch ATP-PP_i-Austauschreaktionen (vgl. Kapitel 4.3.1), in Gegenwart der entsprechenden Substrataminosäuren L¹⁴Phe (TycA(B3), TycB3, TycB3(A)), L¹⁴Pro ((C1)TycB1) und L¹⁴Asn (TycC1, (B1)TycC1) überprüft. Es zeigte sich, dass der Austausch der COM-Domänen keinen Einfluss auf die Aktivität der A-Domäne hatte. So erfolgte die Aktivierung der Substrataminosäure zu 95 – 98% im Vergleich zu den natürlichen Enzymen (Abb. 5.13 A).

In Beladungsreaktionen wurde untersucht, ob die aktivierten Aminosäuren auf die PCP-Domänen übertragen werden. Durch *in vitro* Modifizierung wurden die hybriden Enzyme in die aktive *holo*-Form überführt und anschließend mit radioaktiv markierten Aminosäuren [¹⁴C]-L¹⁴Phe und [¹⁴C]-L¹⁴Pro beladen. Alle getesteten Enzyme waren in der Lage, ihre Substrataminosäure als Aminoacyl-S-P_{ant} zu binden. Auch hier zeigten Mutanten und Wildtyp-Proteine vergleichbare Aktivität. Während die Donormodule die Substrataminosäure L¹⁴Phe zu 25-36% kovalent banden, erfolgte die Beladung der Prolin aktivierenden Akzeptor-Module TycB1 bzw. (C1)TycB1 zu 54% bzw. 49%. Die beiden Asparagin aktivierenden Enzyme TycC1 und (B1)TycC1

wurden nicht getestet, da die radioaktiv markierte Substrataminosäure nicht kommerziell erhältlich ist (Abb. 5.13 B).

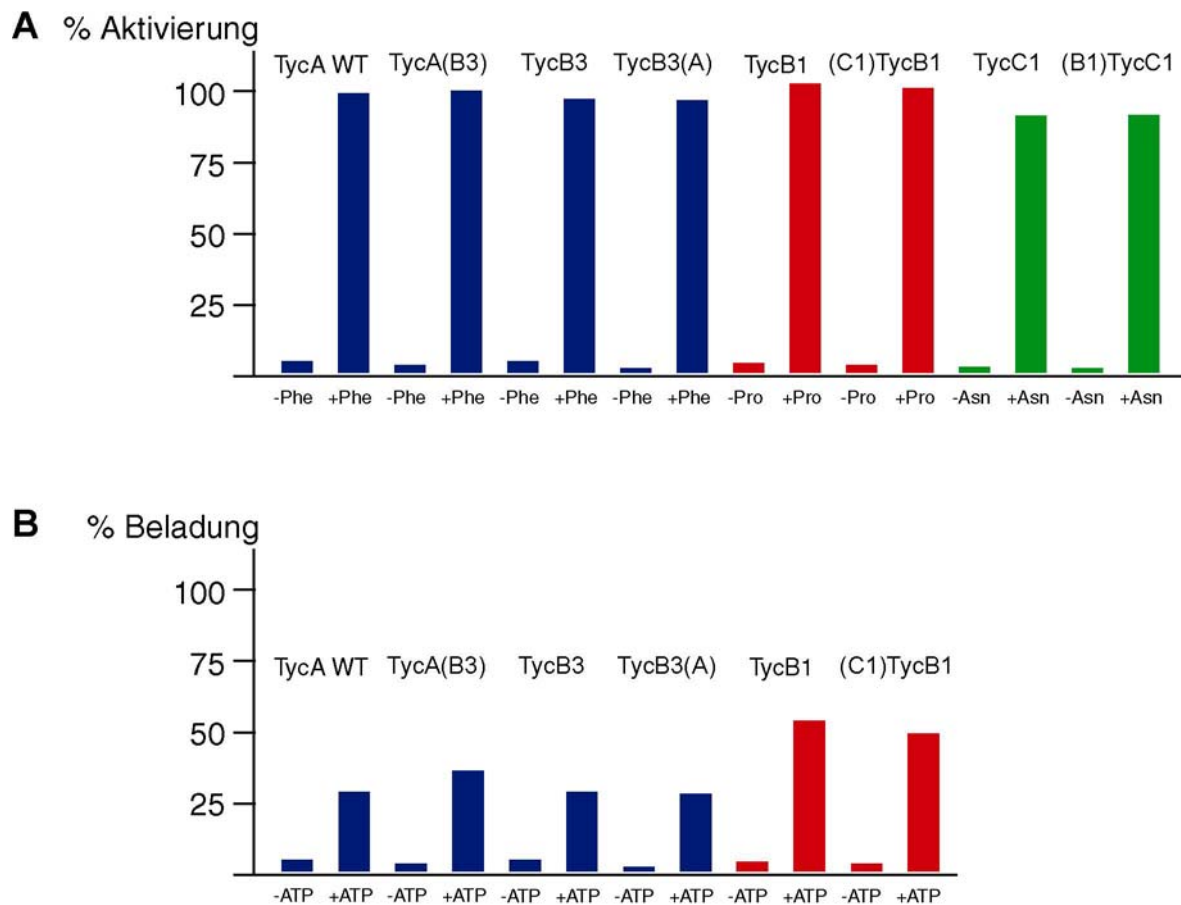


Abb. 5.13: Aktivierungs- und Beladungsreaktion der Donor- und Akzeptorenzyme. Alle Enzyme zeigen die erwartete Aktivität bezüglich ihrer Substrataminosäure (die höchste Inkorporation von [32 P]-PP_i in ATP wurde gleich 100% gesetzt) **(A)**. Die auf ihre Beladungsaktivität getesteten Donorenzyme zeigen vergleichbare Beladungswerte für die Substrataminosäure L_{Phe} (25-36%). Von den Akzeptorenzymen wurden nur die Prolin aktivierenden Module TycB1 und (C1)TycB1 getestet, die L_{Pro} zu 54% bzw. 49% beladen **(B)**.

5.2.3 Produktbildung zwischen Partner- und Nichtpartner NRPSs

Die Bedeutung der COM-Domänen für den Aufbau der Protein-Protein Kommunikation in Partner-NRPS sowie die Unterdrückung einer Interaktion zwischen Nichtpartner-NRPS sollte durch Produktbildungsassays nachgewiesen werden. Für diese Untersuchung standen die Donorenzyme (Domänenorganisation A-PCP-E) TycA und TycB3 bzw. deren hybride NRPSs TycA(B3) und TycB3(A), welche alle DPhe aktivieren, sowie die Akzeptorenzyme (Domänenorganisation C-A-PCP) TycB1 und TycC1 bzw. deren Hybride (C1)TycB1 und (B1)TycC1, die selektiv LPro bzw. LAsn aktivieren, zur Verfügung. In Abhängigkeit des verwendeten Akzeptorpartners wurde die Bildung von zwei Dipeptiden, DPhe-LPro-DKP ($[M+H]^+ = 245,1 \text{ m/z}$) bzw. DPhe-LAsn ($[M+H]^+ = 280,1 \text{ m/z}$), erwartet. Durch Kombination aller Donor- und Akzeptorenzyme ergaben sich sechzehn Möglichkeiten. Diese 16 verschiedenen Enzympaare wurden mit ihren jeweiligen Substrataminosäuren inkubiert und anschließend durch HPLC/MS-Analyse auf ihre Fähigkeit zur Produktbildung getestet.

Im Falle des Wildtyp-Systems TycA/TycB1 wurde die Bildung des erwarteten Produktes DPhe-LPro-DKP beobachtet. Dagegen konnte in Systemen, die Enzyme mit Nichtpartner-COM-Domänen enthielten (TycA(B3)/TycB1 bzw. TycA/(C1)TycB1), keine Produktbildung nachgewiesen werden. Dieses Defizit konnte durch Bereitstellung des COM-Domänenpaares (COM(B3)/(COM(C1))) im System TycA(B3)/(C1)TycB1 kompensiert werden, wodurch die Bildung von DPhe-LPro-DKP rekonstituiert wurde (Abb. 5.14).

Ein analoges Verhalten wurde für die Systeme TycB3/TycC1 und TycB3(A)/(B1)TycC1 beobachtet. Diese waren zur Bildung des entsprechenden Dipeptids DPhe-LAsn in der Lage, da in ihnen COM-Domänenpaare vorhanden sind, die auch im natürlichen System den intermolekularen Übergang zwischen zwei Synthetasen vermitteln (Partner-COM-Domänen). Systeme, die hingegen Nichtpartner-COM-Domäne enthielten, waren nicht zu einer Produktbildung befähigt.

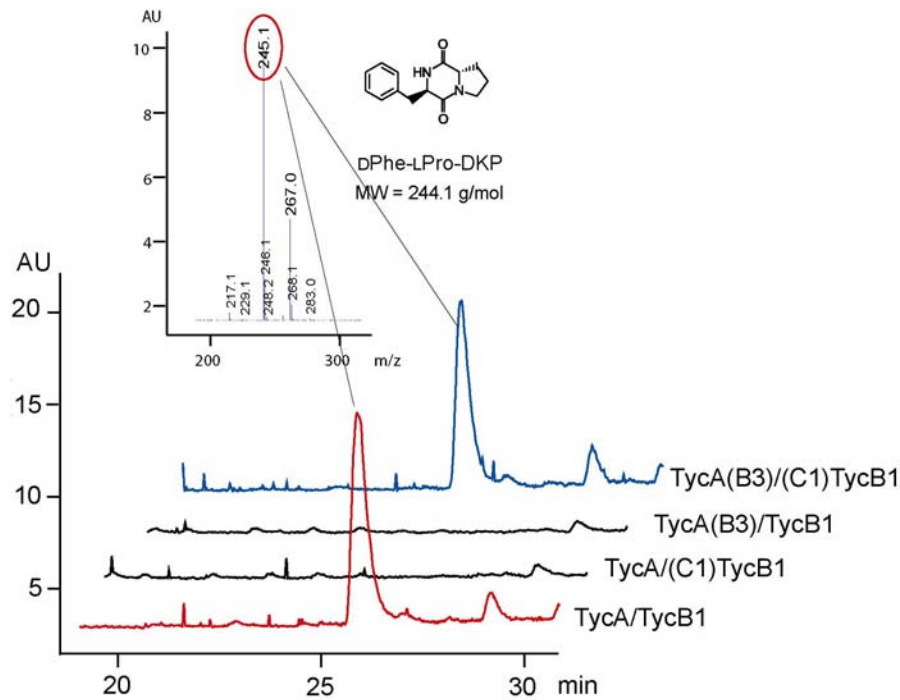
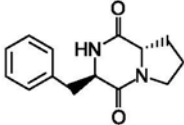


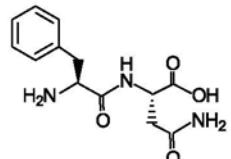
Abb. 5.14: HPLC/MS-Auswertung des COM-Domänen austausch im System TycA/TycB1. Die Bildung des erwarteten Dipeptid-Produktes DPhe-LPro-DKP erfolgte nur in den Systemen TycA/TycB1 und TycA(B3)/(C1)TycB1, da diese über ein Paar aus COM-Domänen verfügten, welches auch im natürlichen System am selben intermolekularen Übergang beteiligt ist. Systeme mit COM-Domänenpaaren (TycA/(C1)TycB1 und TycA(B3)/TycB1), die normalerweise an unterschiedlichen Übergängen eines Biosynthesesystems beteiligt sind, waren nicht zur DKP-Bildung befähigt.

Generell wird in der Natur lediglich die Kommunikation zwischen Partner-NRPSs (z.B. TycA/TycB1 und TycB3/TycC1) beobachtet. Diese produktive Interaktion kann durch den Austausch jeweils einer Akzeptor- oder Donor-COM-Domäne (TycA(B3)/TycC1 und TycA/(B1)TycC1) vollständig unterbunden werden. Das daraus resultierende Defizit kann aber dadurch kompensiert werden, indem Enzympaare verwendet werden, die über einen Satz an natürlichen Partner-COM-Domänen verfügten (TycA(B3)/(C1)TycB1 bzw. TycB3(A)/(B1)TycC1). Die Gegenwart eines natürlichen Partner-COM-Domänenpaares ermöglicht außerdem die Kommunikation zwischen Nicht-Partner-NRPSs, so dass die Systeme TycA(B3)/TycC1 und TycA/(B1)TycC1 zur Bildung des Dipeptids DPhe-LAsn, in der Lage sind, während die Systeme TycB3/(C1)TycB1 und TycB3(A)/TycB1 DPhe-LPro-DKP produzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Aufbau der Protein-Protein-Kommunikation lediglich durch die Gegenwart eines natürlichen Partner-COM-Domänenpaares vermittelt wird (Abb. 5.15).

		Akzeptormodule			
		TycB1	(C1)TycB1	TycC1-Te	(B1)TycC1
		D ^D Phe-LPro-DKP erwartete Masse: $[M+H]^+ = 245,1$ m/z $[M+Na]^+ = 267,1$ m/z		D ^D Phe-LAsn erwartete Masse: $[M+H]^+ = 280,1$ m/z $[M+Na]^+ = 302,1$ m/z	
Donormodule	TycA	245,1 m/z, 267,1 m/z	n.d.	n.d.	280,1 m/z, 302,1 m/z
	TycA(B3)	n.d.	245,1 m/z, 267,1 m/z	280,1 m/z, 302,1 m/z	n.d.
	TycB3	n.d.	245,1 m/z, 267,1 m/z	280,1 m/z, 302,1 m/z	n.d.
	TycB3(A)	245,1 m/z, 267,1 m/z	n.d.	n.d.	280,1 m/z, 302,1 m/z



D^DPhe-LPro-DKP
MW = 244,1 g/mol
 $[M+H]^+ = 245,1$ m/z



D^DPhe-LAsn
MW = 279,1 g/mol
 $[M+H]^+ = 280,1$ m/z

Abb. 5.15: Zusammenfassung der Ergebnisse der HPLC/MS-Analysen zur Produktbildung zwischen Partner- und Nicht-Partner-NRPSS. Alle 16 möglichen Kombinationen zwischen den getesteten Donorenzymen TycA, TycA(B3), TycB3 und TycB3(A), sowie den Akzeptorenzymen TycB1, (C1)TycB1, TycC1 und (B1)TycC1 wurden getestet und mittels HPLC/MS analysiert. Die Bildung der erwarteten Dipeptid-Produkte D^DPhe-LPro-DKP bzw. D^DPhe-LAsn konnte nur in Systemen nachgewiesen werden, die ein Paar aus kompatiblen COM-Domänen besitzen. Die Abkürzung „n.d.“ bedeutet, dass kein entsprechendes Produkt nachgewiesen werden konnte.

5.2.4 Quantifizierung der Dipeptidbildung im System TycA/TycB1

Die Auswirkungen der beschriebenen COM-Domänenaustausche auf die Produktbildungsrate wurde in zeitabhängigen DKP-Bildungsassays unter Verwendung der Systeme TycA/TycB1, TycA(B3)/TycB1, TycA(B3)/(C1)TycB1, TycA/(C1)TycB1 und TycB3(A)/TycB1 untersucht. Die Bestimmung der Umsatzraten erfolgte analog zu der in Kap. 4.2.2.2 beschriebenen Vorgehensweise. Die Auswertung der Chromatogramme bestätigte, dass eine produktive Protein-Protein-Interaktion und damit eine effiziente Produktbildung nur in Systemen beobachtet wurde, die über einen kompatiblen Satz an COM-Domänen verfügen (TycA/TycB1, TycA(B3)/(C1)TycB1 und TycB3(A)/TycB1), ungeachtet ob es sich dabei um ein

System aus Partner- oder Nichtpartner-NRPS handelte. Die ermittelten Umsatzraten waren für die Systeme TycA/TycB1 und TycA(B3)/(C1)TycB1 nahezu identisch (TycA/TycB1: $k_{obs} = 0,62 \text{ min}^{-1}$; TycA(B3)/(C1)TycB1: $k_{obs} = 0,59 \text{ min}^{-1}$). Im Vergleich dazu war die Produktbildungsrate im System TycB3(A)/TycB1 leicht herabgesetzt ($k_{obs} = 0,38 \text{ min}^{-1}$) (Abb. 5.16).

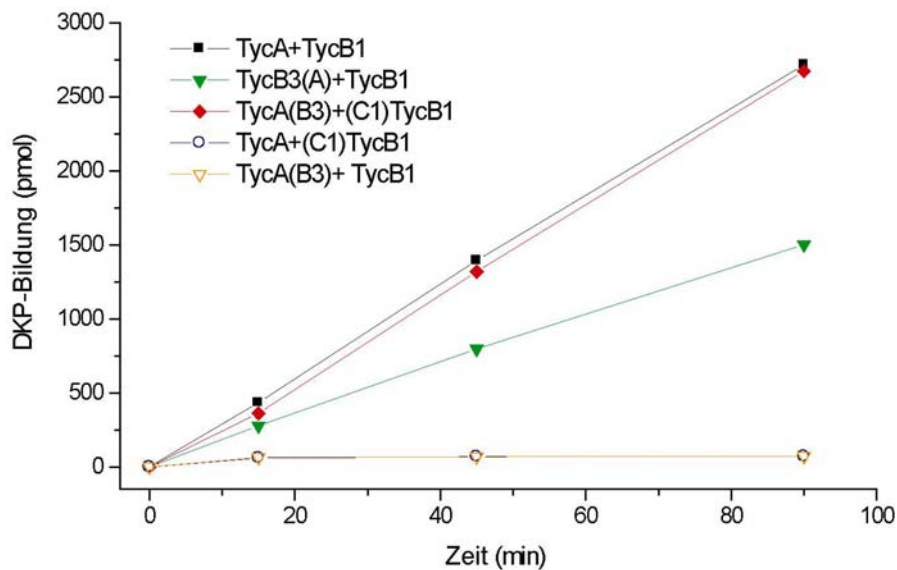


Abb. 5.16: Quantitative HPLC-Analyse der zeitabhängigen dPhe-LPro-DKP-Bildung. Untersucht wurde die Auswirkung von COM-Domänenaustauschen auf die DKP-Produktbildungsrate. Systeme mit kompatiblen COM-Domänenpaaren (TycA/TycB1, TycB3(A)/TycB1, TycA(B3)/(C1)TycB1) sind in der Lage, DKP zu bilden.

Die Unterschiede in den Produktbildungsrate der Systeme TycA/TycB1 und TycB3(A)/TycB1 deuten an, dass kompatible COM-Domänenpaare zwar ausschlaggebend für die spezifische Interaktion zwischen NRPS sind, dass jedoch im gezeigten Beispiel auch der Rest der Donor-Module (ca. 1070 aa) einen Einfluss auf die Effizienz dieser Wechselwirkung besitzen. Dieser Einfluss könnte sich sowohl auf bestimmte Kontaktflächen auf der Oberfläche der Donor-Module beziehen, oder aber auf Unterschiede in den Aktivitäten der beteiligten Domänen (z.B. Aminoacyl- versus Peptidyl-S-Ppant Epimerase).

5.3 Mutations- und Deletionsstudien der E-Domäne und deren Einfluss auf die Dipeptidbildung im System TycA/TycB1

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die ca. 450 C-terminalen Aminosäure-Reste des Donorenzyms TycA die Funktion einer architektonischen Brücke zum Akzeptorenzym TycB1 übernehmen. Durch eine Deletion dieser Reste wird eine produktive Interaktion mit TycB1 verhindert, während der Verlust der in diesem Bereich beherbergten Epimerase-Aktivität (Inaktivierung durch Punktmutagenese) durch Bereitstellung des geeigneten D^pPhe-Substrates kompensiert werden kann [Stachelhaus et al., 1998; Stachelhaus und Walsh, 2000; Linne et al., 2000]. Aufgrund der in dieser Arbeit bisher gewonnenen Erkenntnisse beherbergen die ca. 450 C-terminalen Aminosäure-Reste von TycA jedoch nicht nur die E-Domäne sondern auch die Donor-COM-Domäne COM(A).

Durch Mutations- und Deletionsstudien sollte nun geprüft werden, inwieweit die E-Domäne von TycA einen produktiven Beitrag zur Protein-Protein-Interaktion mit dem Partner-NRPS TycB1 leistet. Dazu wurden mehrere Konstrukte generiert und getestet. Die Mutante TycA(H743A) mit der Domänenorganisation A-PCP-E*-COM(A) sollte durch die Mutation des hochkonservierten Histidins 743 (fett hervorgehoben) im Core-Motiv **H**HXLVDXXS der E-Domäne in ihrer Epimerase-Aktivität inhibiert sein. Als weiteres Konstrukt wurde ein Initiationsenzym verwendet, dass sowohl um die E- als auch die COM(A)-Domäne verkürzt ist und somit die Domänenorganisation A-PCP Δ E(A) besitzt. [Stachelhaus et al., 1998]. In der letzten konstruierten Mutante (Domänenorganisation TycA(A) Δ E) wurde dagegen lediglich die E-Domäne deletiert und eine artifizielle Fusion zwischen PCP und COM(A)-Domäne erzeugt.

Die Einführung der Mutation H743A in das kodierende Genfragment im Plasmid *pTrcHis-tycA* erfolgte unter Verwendung des „*site directed mutagenesis kit*“ (Stratagene, Heidelberg). Das überproduzierte Protein TycA H743A wurde durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie annähernd zur Homogenität gereinigt und anschließend die katalytische Aktivität der einzelnen Domänen sowohl durch ATP-PP_i-Austausch als auch in einer Beladungsreaktion überprüft.

Die Analyse zeigte, dass die eingeführte Mutation keine Auswirkungen auf die katalytische Aktivität der A- und PCP-Domäne hatte. So war die Mutante in der Lage, die Substrataminosäure L^pPhe in vergleichbarer Effizienz zu aktivieren wie das natürliche Enzym TycA. Im Falle der Beladungsreaktion wurde die Mutante zu 28%

mit der Substrataminosäure [^{14}C]-LPhe beladen und zeigte identische Beladungswerte wie TycA (Abb. 5.17).

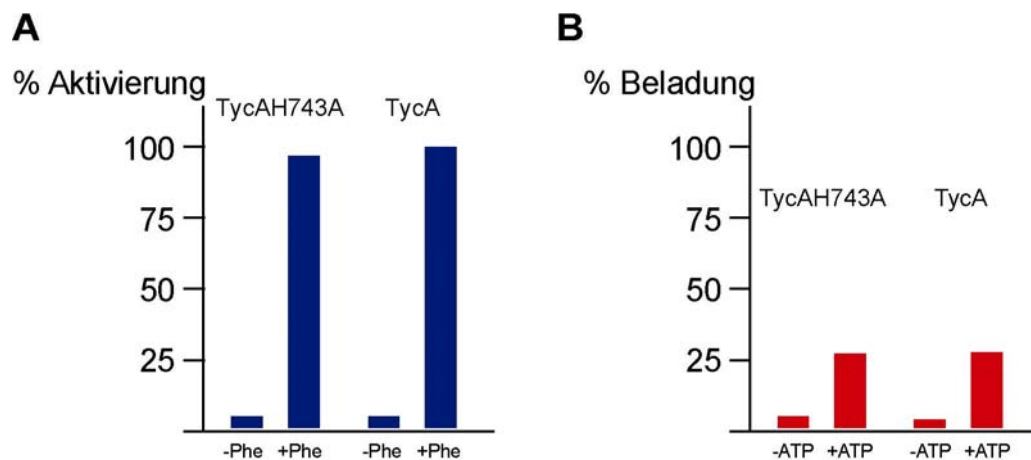


Abb. 5.17: Ergebnisse der Adenylierungs- und Beladungsreaktion der Mutante TycA H743A. Die getestete Mutante zeigte im Vergleich zum natürlichen Donorenzym TycA identisches Verhalten hinsichtlich Substrataktivierung (A) und Beladung der PCP-Domäne (28 %) (B).

Die Deletion des kodierenden Genfragmentes der E-Domäne erfolgte mittels inverser PCR des Plasmides *pTrcHis-tycA*, was zur Bildung von *pTrcHis-tycA(A)ΔE* führte.

Durch Transformation von *E. coli* M15(pRep4)-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid und nachfolgende Expression konnte das Genprodukt TycA(A)ΔE erhalten werden. Nach erfolgreicher Reinigung des Enzyms durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie wurde anschließend die katalytische Aktivität der einzelnen Domänen sowohl durch ATP-PP_i-Austausch als auch in einer Beladungsreaktion überprüft. Ebenso wurde das bereits bekannte Enzym TycAΔE(A) [Stachelhaus et al., 1998] überproduziert, gereinigt und biochemisch charakterisiert. Dabei zeigten die beiden verkürzten Donorenzyme TycA(A)ΔE und TycAΔE(A) sowohl im Hinblick auf eine Aktivierung der Substrataminosäure LPhe (TycA 100%; TycA(A)ΔE 96%; TycAΔE(A) 90%), als auch auf die Beladung der PCP-Domäne (TycA 28%; TycA(A)ΔE 34%; TycAΔE(A) 34%) vergleichbare Aktivität wie das natürliche Enzym TycA. Die Deletion der E-Domäne bzw. E-Domäne und COM(A)-Domäne hatte somit keine Auswirkung auf die katalytische Effizienz der A- und PCP-Domäne (Abb. 5.18).

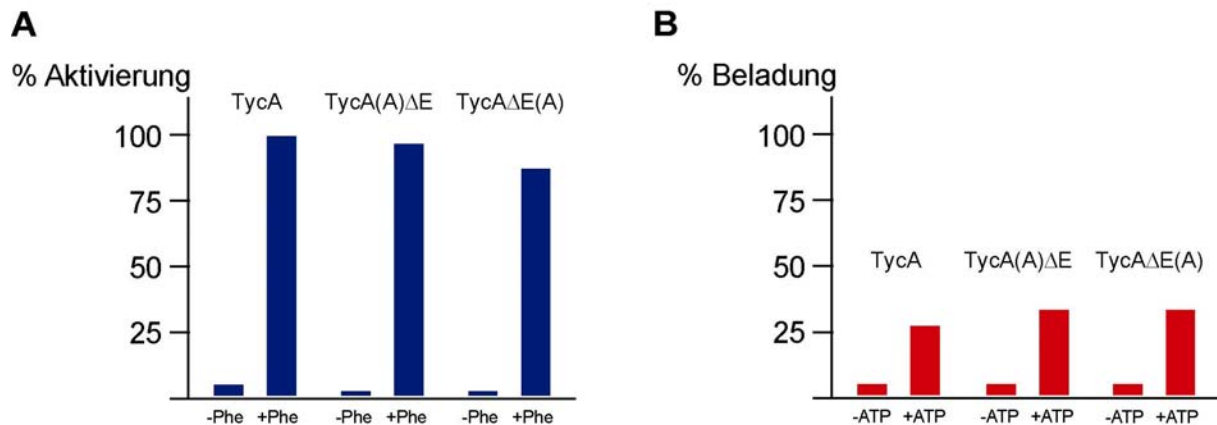


Abb. 5.18: Ergebnisse der Adenylierungs- und Beladungsreaktion der Donorenzyme TycA(A)ΔE und TycAΔE(A). Beide Enzyme zeigten im Vergleich zum natürlichen Donorenzym TycA nahezu identisches Verhalten hinsichtlich der Substrataktivierung (A). Die Beladung der PCP-Domäne erfolgte mit zu je 34% etwas höher als bei TycA (28%) (B).

Die anschließenden Produktbildungsassays wurden im System TycA/TycB1, TycA H743A/TycB1, TycA(A)ΔE/TycB1 bzw. TycAΔE(A)/TycB1 in Gegenwart von markiertem [^{14}C]-LPro und den nichtmarkierten Substraten LPhe und DPhe durchgeführt. Im System TycA/TycB1 sollte es unerheblich sein, ob LPhe oder DPhe als Substrataminosäure für das Donorenzym TycA zur Verfügung steht. In beiden Fällen ist eine intermolekulare Kommunikation zwischen den Synthetasen und die Berücksichtigung der C-Domänenselektivität von TycB1 gegeben, was zur Bildung von DPhe-[^{14}C]-LPro-DKP führt. Eine infolge der Mutation inaktive E-Domäne würde dagegen dazu führen, dass im System TycA H743A/TycB1 in Gegenwart von LPhe kein Dipeptid und damit auch kein DPhe-[^{14}C]-LPro-DKP gebildet würde. Dagegen sollte in Gegenwart von DPhe eine Peptidbildung möglich sein, da der C-Domänenselektivität der C-Domäne Rechnung getragen wird.

Falls die Existenz eines Partner-COM-Domänenpaares das alleinige Kriterium für die intermolekulare Interaktion zwischen zwei Synthetasen darstellt, so sollte das System TycA(A)ΔE/TycB1 unter Berücksichtigung der C-Domänenselektivität von TycB1 in der Lage sein, das entsprechende DPhe-[^{14}C]-LPro-DKP bei der Zugabe von DPhe zu bilden. Sollte der E-Domäne eine zusätzliche Funktion als Platzhalter oder Spacer zukommen und die COM(A)-Domäne in eine bestimmte Position dirigieren, so könnte sich dies auf die Produktbildungsraten im Vergleich zum natürlichen System TycA/TycB1 auswirken. Das System TycAΔE(A)/TycB1 sollte dagegen aufgrund der fehlenden COM(A)-Domäne auf keinen Fall zur Produktbildung befähigt sein.

Die Auswertung der Produktbildungsassays bestätigte die zuvor gemachten Annahmen. So konnte im System TycA/TycB1 sowohl in Gegenwart von LPhe als auch DPhe das erwartete DPhe- ^{14}C -LPro-DKP nachgewiesen werden. Die Produktbildungsraten waren mit $k_{\text{obs}} = 0,53 \text{ min}^{-1}$ (für LPhe) und $k_{\text{obs}} = 0,55 \text{ min}^{-1}$ (für DPhe) nahezu identisch. Im Unterschied dazu konnte für das System TycA H743A/TycB1 nur in Gegenwart von DPhe eine DKP-Bildung beobachtet werden, die mit einer Umsatzrate von $k_{\text{obs}} = 0,50 \text{ min}^{-1}$ annähernd der des natürlichen Enzyms entsprach. In Gegenwart von LPhe war das System TycA H743A/TycB1 dagegen nicht in der Lage, DKP zu bilden. Im Gegensatz hierzu war das System TycA Δ E(A)/TycB1 weder in Gegenwart von LPhe noch DPhe in der Lage, das entsprechende DPhe- ^{14}C -LPro-DKP zu bilden. Auch im System TycA(A) Δ E/TycB1 konnte in Gegenwart von LPhe keine Produktbildung beobachtet werden. Gibt man hingegen DPhe als Substrataminosäure hinzu, so kam es zur Bildung von DPhe- ^{14}C -LPro-DKP. Die bestimmte Produktbildungsrate mit $k_{\text{obs}} = 0,48 \text{ min}^{-1}$ ist nahezu identisch mit der beobachteten Produktbildung im System TycA/TycB1 ($k_{\text{obs}} = 0,53 \text{ min}^{-1}$ (für LPhe) und $k_{\text{obs}} = 0,55 \text{ min}^{-1}$ (für DPhe)) (Abb. 5.19).

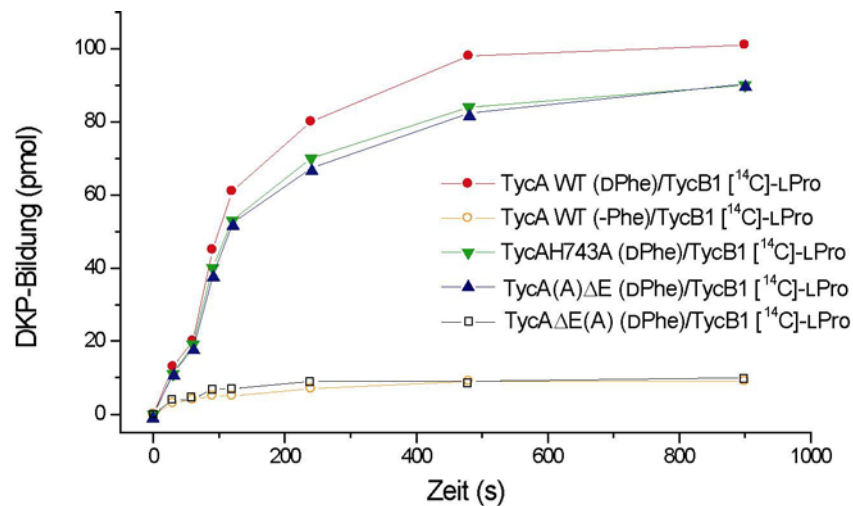


Abb. 5.19: DKP-Bildung in Abhängigkeit mutierter bzw. verkürzter Donorenzyme. Alle Reaktionen wurden in Gegenwart von DPhe als Substrataminosäure durchgeführt. Dabei bildeten die Donorenzyme TycAH743A bzw. TycA(A) Δ E mit TycB1 das erwartete Produkt DPhe-LPro-DKP. Die Produktbildungsrate lag dabei im Bereich des natürlichen Systems TycA/TycB1. Dagegen war das Donorenzym TycA Δ E(A) in Gegenwart von DPhe nicht in der Lage, das entsprechende Dipeptid zu bilden und zeigte den gleichen Reaktionsverlauf wie die Kontrollreaktion. Alle in Gegenwart von LPhe durchgeführten Produktbildungsassays zeigten mit Ausnahme des natürlichen System Tyc/TycB1 den gleichen Reaktionsverlauf wie die Kontrollreaktion (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchungen zeigten, dass die E-Domäne keinen Beitrag zur Protein-Protein-Kommunikation zwischen TycA und TycB1 liefert. Die produktive Interaktion zwischen beiden Modulen hängt vielmehr von der Präsenz eines vollständigen Paares von Partner-COM-Domänen ab (vgl. TycA Δ E(A)/TycB1 versus TycA(A) Δ E/TycB1). Ferner von Bedeutung ist die Bereitstellung einer adäquaten Substrataminosäure, entsprechend der Stereoselektivität der beteiligten C-Domäne.

Die Funktionalität des artifiziellen Systems TycA(A) Δ E/TycB1 stellt darüber hinaus die für biokombinatorische Anwendungen bedeutende Portabilität von COM-Domänen unter Beweis. Die in Kap. 5.2 beschriebenen COM-Domänenaustausche wurden noch äußerst konservativ durchgeführt (jeweils am NRPS-Übergang zwischen E- und C-Domäne) und orientierten sich an hochkonservierten Sequenzmotiven als geeignete Fusionsstellen. Im Konstrukt TycA(A) Δ E hingegen wurde die Donor-COM-Domäne (A) artifiziell an eine PCP-Domäne fusioniert und damit in ein komplett anderes strukturelles Umfeld innerhalb einer NRP-Biosynthesematrize gebracht. Dennoch zeigte das um ca. 430 Aminosäure-Reste verkürzte NRPS annähernd Wildtyp-Aktivität im Produktbildungs-Assay mit TycB1.

5.4 Cross-talk zwischen unterschiedlichen nichtribosomalen Biosynthesesystemen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass kompatible COM-Domänenpaare essentiell für die Etablierung von produktiven Protein-Protein-Interaktionen zwischen NRPSs sind. Diese Funktion der COM-Domänen wurde bislang jedoch lediglich an Modellsystemen getestet, die sich vom Tyrocidin-Biosynthese-Komplex ableiten. Nachfolgend sollte daher die Universalität von COM-Domänen untersucht und ihre Existenz in unterschiedlichsten, multienzymatischen NRP-Biosynthese-Systemen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die Primärsequenzen von NRPSs aus verschiedenen bakteriellen NRP-Systemen an den intermolekularen Übergängen zwischen E- und C-Domänen mittels Sequenzvergleich analysiert (Abb. 5.20).

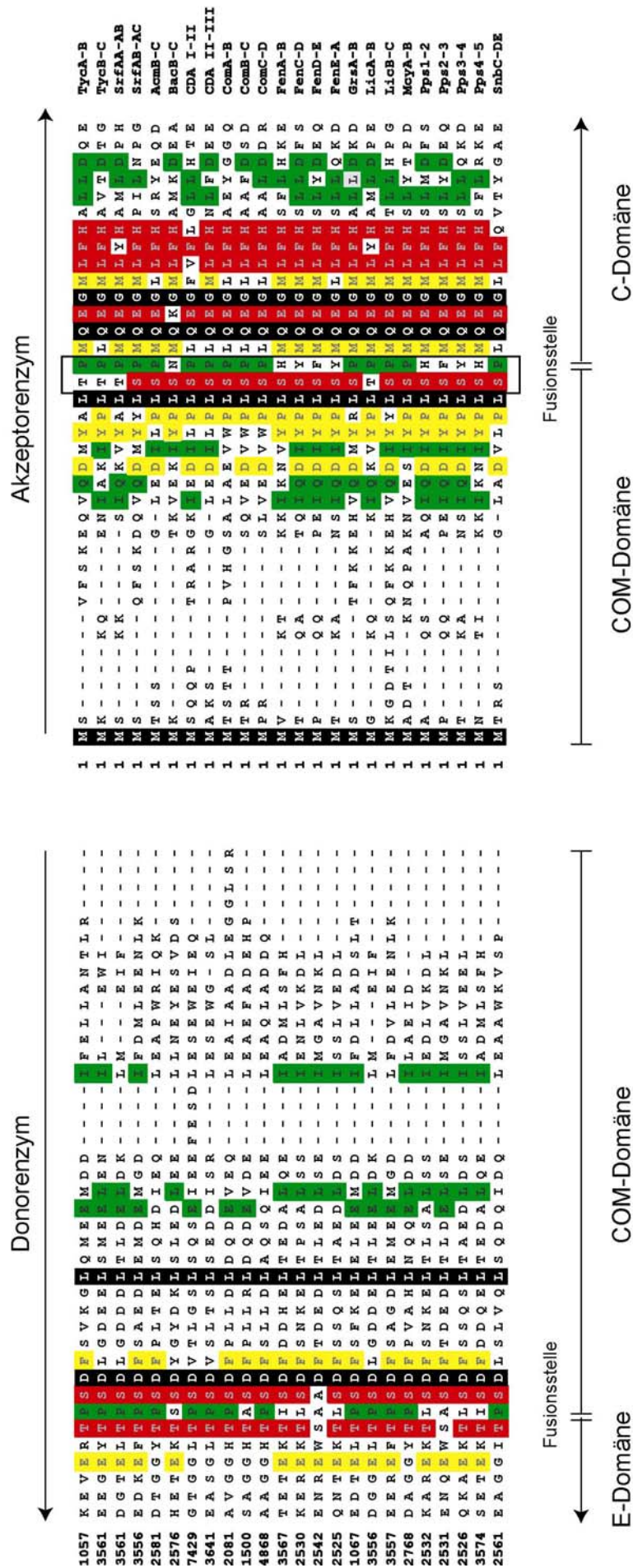


Abb. 5.20: Sequenz-Alignment zur Lokalisierung von Kommunikations-vermittelnden (COM)-Domänen. Dargestellt ist der Übergang zwischen E- und C-Domänen in verschiedenen NRP-Biosynthesesystemen, wobei nur jeweils die äußersten C-terminalen Aminosäurereste der Donormodule und die äußersten N-terminalen Aminosäurereste der korrespondierenden Akzeptormodule gezeigt sind. Konservierte Aminosäure-Reste sind farbig hervorgehoben, wobei gleiche Farben gleichgroße Konservierung anzeigen. Invariante Aminosäure-Reste sind schwarz gekennzeichnet. Die Lokalisierung der C- und N-terminalen COM-Domänen sowie die Fusionsstellen am Übergang zwischen E- und COM-Domänen bzw. COM- und C-Domänen sind entsprechend gekennzeichnet.

Die Alignments zeigen, dass die in Kapitel 5.2 für das Tyrocidin-Biosynthesystem ermittelten, hochkonservierten Sequenzmotive TPSD (Donor-Seite) und L(T/S)P(M/L)QEG. (Akzeptor-Seite) offensichtlich in allen untersuchten Biosynthese-Systemen anzutreffen sind. Anhand dieser hochkonservierten Sequenz-Motive können folglich – in Analogie zu Kapitel 5.2 – die Bereiche putativer COM-Domänen auch in den untersuchten NRP-Biosynthese-Systemen detektiert werden. Die putativen Donor-COM-Domänen (COM^D-Domänen) besitzen eine Größe von 20-30 Aminosäuren, während die Akzeptor-COM-Domänen (COM^A-Domänen) mit 15-20 Aminosäuren etwas kürzer sind. Sowohl COM^D-Domänen als auch COM^A-Domänen zeigen untereinander nur geringe Sequenzhomologien.

Auffällig ist jedoch das überproportional hohe Auftreten von aciden Aminosäure-Resten in den putativen COM^D-Domänen. Statistisch würde man einen Anteil von 10% bezogen auf die Länge der COM^D-Domäne erwarten; tatsächlich stellt man aber fest, dass der Anteil an sauren Aminosäureresten mehr als dreimal so hoch ist (33%). Dagegen ist der tatsächliche Anteil an polaren bzw. basischen Aminosäuren mit 18% bzw. 4% nur etwa halb so groß, wie aufgrund des statistischen Mittels zu erwarten wäre (30% bzw. 10%). In COM^A-Domänen ist dagegen eine statistische Verteilung acider, basischer, polarer und hydrophober Reste gegeben. Der pI-Wert von COM^A-Domänen ist daher annähernd neutral und beträgt im Mittel 6,6. Die hohe Zahl saurer und die geringe Zahl basischer Reste sorgen dafür, dass der pI-Wert in COM^D-Domänen im Mittel bei 3,3 liegt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Interaktionen zwischen COM-Domänen-Paaren vorrangig über polare und/oder elektrostatische Wechselwirkungen etabliert werden.

5.4.1 Interaktion zwischen Synthetasen aus unterschiedlichen Biosynthesystemen – „Cross-talk“ und „proof of principle“

In zahlreichen *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Gramacidin S-Synthetase A das homologe NRPS TycA bei der Initiation der Tyrocidin-Biosynthese funktionell ersetzen kann. Dies weist darauf hin, dass GrsA und TycB1 in produktive Interaktion miteinander treten, und folglich – gemäß des in den vorangegangenen Abschnitten entwickelten Modells – die COM^D-Domäne von GrsA und die COM^A-Domäne von TycB1 ein kompatibles COM-Domänenpaar bilden. In der Tat zeigt eine genauere Analyse, dass für den Bereich der COM-Domäne eine Homologie von 83% und eine Identität von 67% bezogen auf die Aminosäurefolge besteht.

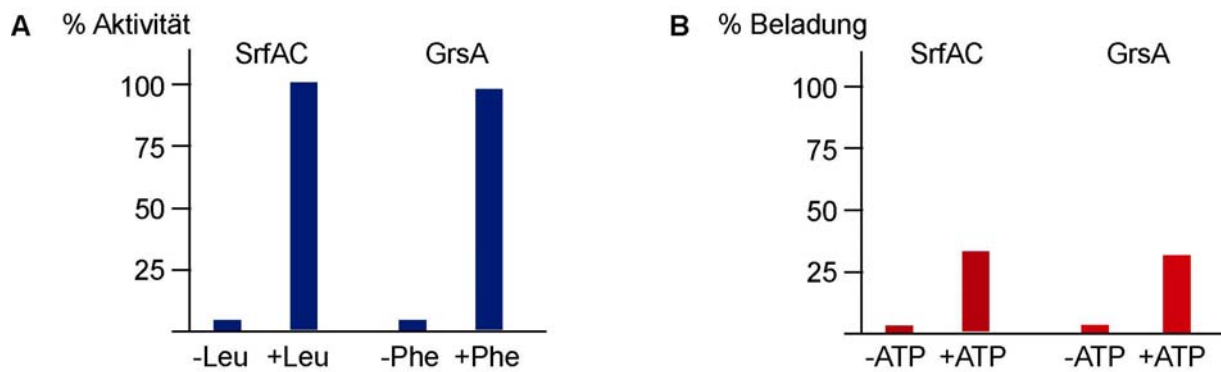


Abb. 5.22: Biochemische Charakterisierung von SrfAC und GrsA. Die durchgeführten Tests belegen die Aktivität von SrfAC und GrsA bezüglich der Substrataktivierung (**A**) und der kovalenten Bindung an den 4'-Ppant-Kofaktor des PCP (**B**). Das PCP wurde zu 40% (SrfAC) mit der Substrataminosäure Leucin beladen, die Beladung des PCP von GrsA mit Phenylalanin erfolgte zu 30%. Kontrollreaktionen wurden in Abwesenheit der Substrataminosäuren Leucin bzw. Phenylalanin (**A**) bzw. ohne ATP (**B**) durchgeführt.

5.4.2 COM-Domänen vermittelte Produktbildung im System TycA/SrfAC und GrsA/SrfAC

Die Analysen der Einzelaktivität der A- und PCP-Domäne belegten die Funktionalität von SrfAC bezüglich Adenylierung und Beladung. Nachfolgend wurden die rekombinanten Enzyme in Produktbildungs-Assay getestet und die Dipeptidbildung durch HPLC/MS-Analysen untersucht. Als Kontrollen dienten die natürlichen Partner-NRPS bzw. einzelne COM-Domänenaustausch-Konstrukte.

Durch Inkubation der Enzyme TycA und SrfAC mit ATP und den Substrataminosäuren Phenylalanin und Leucin konnte mittels HPLC/MS-Analyse die Bildung des erwarteten Produktes DPhe-LLeu (bei 30,8 min, $[M+H]^+ = 279,1$ m/z, berechnete Masse 279 m/z und $[M+Na]^+ = 301,1$ m/z, berechnete Masse 301 m/z) nachgewiesen werden (Abb. 5.23). Kontrollreaktionen, in denen abwechselnd Enzym oder Substrataminosäure einer der Komponenten fehlte, ergaben keine Produktbildung. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die COM^D-Domäne von TycA und die COM^A-Domäne von SrfAC kompatibel sind und die *in trans* Kommunikation zwischen TycA und SrfAC sicherstellt.

Darauf aufbauend sollte untersucht werden, ob die Kommunikation alleine auf der Interaktion zwischen kompatiblen COM-Domänenpaaren beruht oder zusätzliche Wechselwirkungen benötigt werden. Dazu wurden weitere potentielle Donorenzyme TycA(B3), TycB3 und TycB3(A) auf ihre Fähigkeit zur Produktbildung mit SrfAC untersucht. TycA(B3) und TycB3(A) stellen Enzyme dar, deren COM^D-Domänen ausgetauscht wurden (Ursprung der COM-Domäne in Klammern). Sollte nur die

COM-Domäneninteraktion zwischen den Enzymen für die Kommunikation verantwortlich sein, so sollte in den Systemen TycB3/SrfAC und TycA(B3)/SrfAC aufgrund inkompatibler COM-Domänenpaare keine Produktbildung beobachtet werden. Umgekehrt sollte das System TycB3(A)/SrfAC unter dieser Annahme in der Lage, DPhe-LLeu zu bilden. Tatsächlich konnte in den entsprechenden Produktbildungsassays lediglich für das System TycB3(A)/SrfAC die Bildung des Dipeptids DPhe-LLeu nachgewiesen werden, während die anderen System nicht zur Produktbildung in der Lage waren. Damit bestätigte sich auch hier die Theorie, dass alleine die Existenz eines kompatiblen COM-Domänenpaares die Kommunikation zwischen Enzymen kontrolliert.

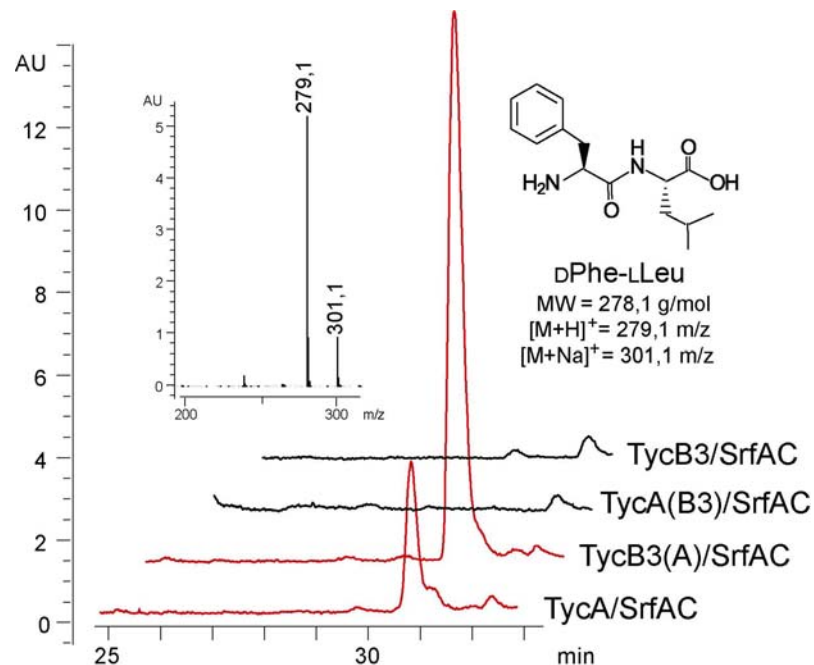


Abb. 5.23: Kommunikation zwischen Tyrocidin- und Surfactin-Biosynthese-System. Die HPLC/MS-Analyse ergab, dass Systeme, die aufgrund von Sequenzanalysen kompatibel hinsichtlich ihrer Partner-COM-Domänenpaare waren (TycA/SrfAC bzw. TycB3(A)/SrfAC) in der Lage waren, das erwartete Dipeptid DPhe-LLeu (Retentionszeit: 30,8 min; $[M+H]^+ = 279,1$ m/z, $[M+Na]^+ = 301,1$ m/z) zu bilden. Dagegen waren Systeme, die inkompatible COM-Domänenpaare besitzen (TycA(B3)/SrfAC bzw. TycB3/SrfA) dazu nicht befähigt.

Dieser Sachverhalt konnte auch für das System GrsA/SrfAC beobachtet werden. Durch Inkubation der Enzyme GrsA und SrfAC mit ATP und den Substrataminosäuren Phenylalanin und Leucin konnte mittels HPLC/MS-Analyse tatsächlich die Bildung des erwarteten Produktes DPhe-LLeu (bei 30,8 min, $[M+H]^+ = 279,1$ m/z, berechnete Masse 279 m/z und $[M+Na]^+ = 301,1$ m/z, berechnete Masse

301 m/z) nachgewiesen werden. Die Kontrollreaktion, in der die Substrataminosäure LPhe fehlte, ergab erwartungsgemäß keine Produktbildung (Abb. 5.24).

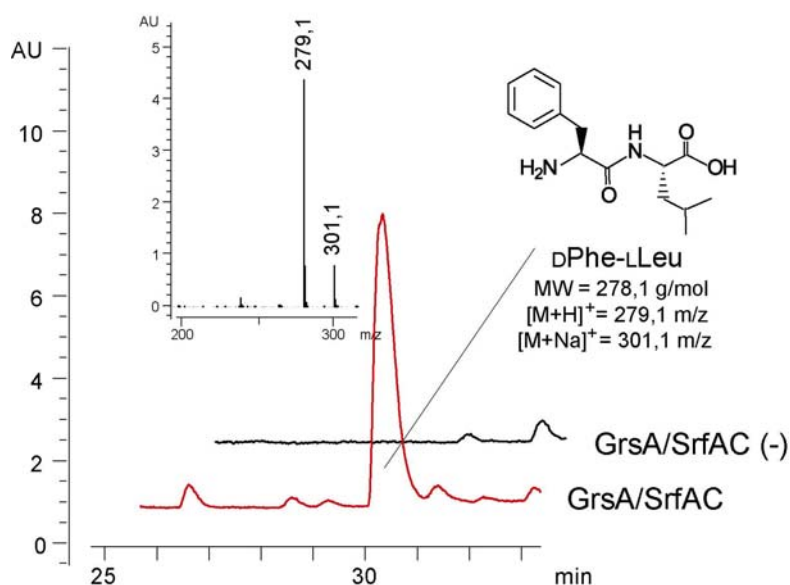


Abb. 5.24: Kommunikation zwischen dem Gramicidin- und dem Surfactin-Biosynthesesystem. Die HPLC/MS-Analyse ergab, dass die aufgrund von Sequenzanalysen vorhergesagte Kompatibilität der Partner-COM-Domänenpaare von GrsA und SrfAC gegeben war und das erwartete Dipeptid DPhe-LLeu (Retentionszeit: 30,8 min; $[M+H]^+ = 279,1 \text{ m/z}$, $[M+Na]^+ = 301,1 \text{ m/z}$) zu bilden. Ein Fehlen der Substrataminosäure LPhe führte im System GrsA/SrfAC zu keiner Bildung von DPhe-LLeu.

Die Aufgrund von *in silico* Studien vorhergesagte Universalität von COM-Domänen in multienzymatischen NRP-Biosynthese-Systemen konnte experimentell durch *in vitro* Produktbildungsassays zwischen dem Tyrocidin-, Surfactin und Gramicidin-Biosynthesesystem bestätigt werden. In Gegenwart kompatibler COM-Domänenpaare gelang es dabei, einen *cross-talk* zwischen verschiedenen NRP-Biosynthesesystemen zu etablieren. Dies konnte durch die Verwendung von GrsA als mis-kognater Partner von TycB1 bzw. SrfAC als mis-kognater Partner von TycA gezeigt werden. Darüber hinaus war auch TycB3(A) als artifizieller, mis-kognater Partner von SrfAC in der Lage eine Interaktion zu erzwingen. Um eine effektive Interaktion zu erreichen müssen die COM-Domänen der kognaten und mis-kognaten NRPS nicht notwendigerweise identisch sein, sondern es genügt ein ausreichend hohes Maß an Homologie ($\geq 75\%$).

5.5 Untersuchung von COM-Domänenmutanten

Zu Beginn der Untersuchung wurden kompatible COM-Domänenpaare als essentielle Voraussetzung für die Etablierung einer selektiven intermolekularen Kommunikation zwischen Peptidsynthetasen identifiziert. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Cross-talk zwischen Synthetasen verschiedener Biosynthesystemen erweitern diese Theorie. So kommt es zur Kommunikation zweier Synthetasen *in trans*, sofern die COM-Domäne des artifiziellen Reaktionspartners eine ausreichend hohe Homologie zur COM-Domäne des natürlichen Reaktionspartners besitzen. Dabei ist es unerheblich, ob es sich um die COM-Domäne des Donorenzyms (COM^D-Domäne) oder des Akzeptorenzyms (COM^A-Domäne) handelt.

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welche Reste eines COM-Domänenpaares die Etablierung einer produktiven Interaktion zwischen den NRPS vermitteln und ob es möglich ist, die Kommunikation zwischen Partner-NRPS oder Nicht-Partner-NRPS ggf. durch den Austausch dieser spezifischen Reste innerhalb der beteiligten COM-Domänen gezielt zu unterbinden bzw. zu ermöglichen.

5.5.1 Identifizierung putativer kommunikationsfördernder Aminosäurereste und Konstruktion einer COM-Domänenmutante

Im Kapitel 5.4 konnte gezeigt werden, dass die COM-Domäne von TycA – abgesehen von der kognaten Partner-COM-Domäne von TycB1 – auch mit den mis-kognaten COM-Domänen der Akzeptor-Module SrfAC und GrsB1 interagiert. Letzteres wurde zwar hier nicht explizit gezeigt, ist jedoch aus früheren Untersuchungen bekannt und folgt zu dem indirekt aus der Beobachtung, dass die COM-Domänen von GrsA (kognater Partner: GrsB1) und TycB1 (kognater Partner: TycA) ein kompatibles COM-Domänenpaar bilden. Nachfolgend sollte untersucht werden, warum die COM^D-Domäne von TycA zwar mit den COM^A-Domänen von TycB1, GrsB1 und SrfAC interagieren kann, aber nicht mit der COM^A-Domäne von TycC1. Hierzu wurden zunächst die Primärstrukturen der vier genannten COM^A-Domänen miteinander verglichen (Abb. 5.25).

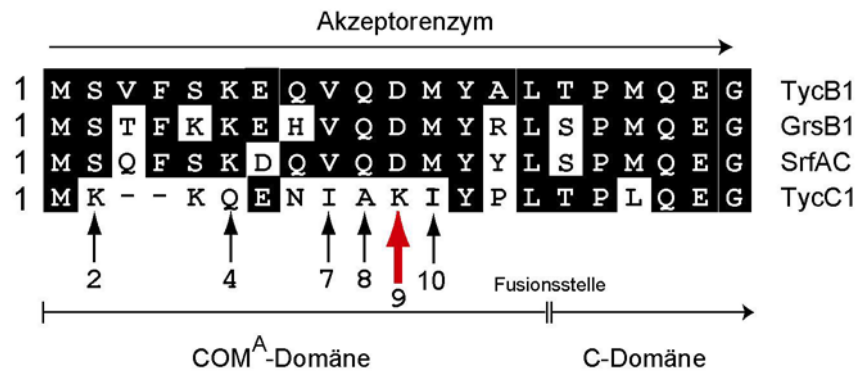


Abb. 5.25: Alignment der COM^A-Domänen von TycB1, GrsB1, SrfAC und TycC1. Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen kognaten bzw. mis-kognaten COM^A-Domänen und der nicht-kognate COM^A-Domäne von TycC1. Auffallend ist der Austausch der aziden Aminosäure Aspartat gegen die basische Aminosäure Lysin an Position 9. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position in der Primärstruktur von TycC1.

Das Alignment zeigt, dass sich die nicht-kognate COM^A-Domäne von TycC1 von den kognaten bzw. mis-kognaten COM^A-Domänen signifikant in folgenden sechs Positionen unterscheidet (Nummerierung bezieht sich auf die Position in der Primärstruktur von TycC1): K2S, Q4K, I7V, A8Q, K9D und I10M. In dieser Auflistung fällt besonders die Substitution einer basischen Aminosäure (Lys) gegen eine acide Aminosäure (Asp) an Position 9 auf. Durch ortsgerichtete Mutagenese sollte daher untersucht werden, inwieweit die selektive Erkennung der kompatiblen COM-Domäne von TycB3 durch den Austausch K9D in der COM-Domäne von TycC1 beeinträchtigt wird bzw. im Umkehrschluss die mis-kognate Interaktion mit der COM-Domäne von TycA gefördert wird. Der Einfluss der Punktmutation K9D in der COM-Domäne von TycC1 wurde im hybriden System (C1)TycB1 generiert. Dies hatte den experimentellen Vorteil, dass alle untersuchten Systeme (auch die Kontrollsysteme) einheitlich über Prolin-aktivierende Akzeptor-Module verfügten und somit eine bessere Vergleichbarkeit untereinander gegeben war.

Die Konstruktion dieser Mutante gelang ausgehend von Plasmid pTrcHis2-(C1)TycB1 unter Verwendung des kommerziell erhältlichen *site-directed mutagenesis kits* (Stratagene, Heidelberg). Durch Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* M15(pRep4)-Zellen mit dem mutierten Plasmid pTrcHis2-(C1)TycB1K9D wurde ein Expressionsstamm hergestellt. Auf diese Weise konnte das rekombinante Genprodukt (C1)TycB1K9D heterolog überproduziert und unter Ausnutzung des Hexahistidintags durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

5.5.2 Biochemische Analyse von C1(TycB1) K9D und Produktbildung

Wie bereits für die Verkürzungsmutanten und COM-Domänenaustausche beschrieben (s. Kap. 5.1.2), mussten zunächst die katalytischen Einzelaktivitäten in bezug auf Adenylierungs- und Beladungsreaktion nachgewiesen werden. Sowohl im Hinblick auf eine Aktivierung der Substrataminosäure Prolin (WT 100% : K9D 98%), als auch auf die Beladung der PCP-Domäne (WT 50% : K9D 48%) zeigte die Mutante (C1)TycB1 K9D vergleichbare Aktivität wie das nicht mutierte Enzym (C1)TycB1. Die Mutation hatte somit keine Auswirkung auf die katalytische Effizienz der A- und PCP-Domäne (Abb. 5.26).

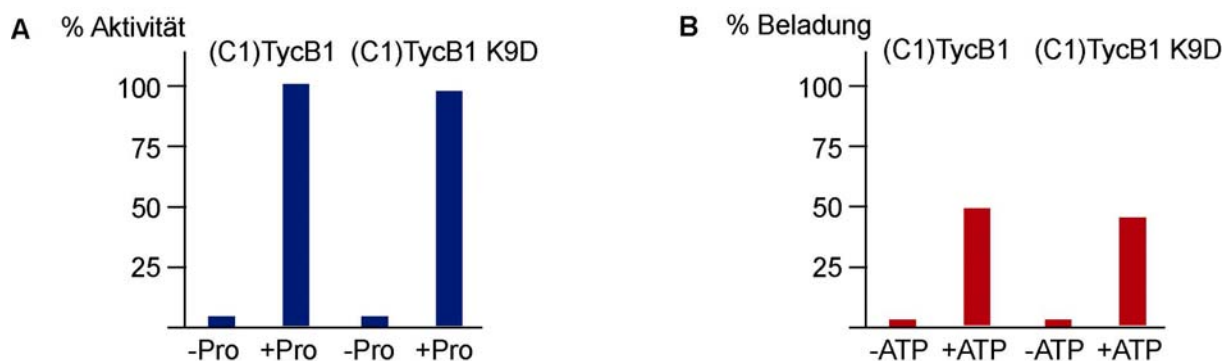


Abb. 5.26: Ergebnis der Adenylierungs- und Beladungsreaktion von (C1)TycB1 K9D. Die Mutante (C1)TycB1 K9D ist im Vergleich zu (C1)TycB1 im gleichen Umfang in der Lage die Substrataminosäure zu aktivieren **(A)** als auch kovalent an den Kofaktor der PCP-Domäne zu binden **(B)**.

In den anschließend durchgeführten Produktbildungsassays wurde überprüft, ob die Mutation einen Einfluss auf die Interaktion mit den Donor-COM-Domänen von TycA bzw. TycA(B3) hatte. Durch die Untersuchungen im Rahmen der COM-Domänenaustausche war bekannt, dass die COM-Domänen COM(A) und COM(C1) nicht interagieren. Hingegen war das System TycA(B3)/(C1)TycB1 aufgrund des Partner-COM-Domänenpaares COM(B3)/COM(C1) in der Lage, DKP zu bilden.

Im ersten Experiment wurde die Mutante (C1)TycB1K9D auf ihre Fähigkeit untersucht, mit dem Donormodul TycA zu interagieren. Eine Produktbildung im System TycA/(C1)TycB1K9D würde damit die Theorie, dass die identifizierten Aminosäurepaare maßgeblich an der Ausbildung der COM-Domäneninteraktion beteiligt sind, untermauern. Umgekehrt wurde im zweiten Experiment TycA(B3) als Donor-Partner für die Mutante gewählt. In diesem System sollte aus der gleichen

Überlegung heraus die Interaktion zwischen den beiden COM-Domänen geschwächt werden, was sich in einer reduzierten Produktivität niederschlagen sollte.

Die Produktbildung wurde sowohl in einem radioaktiv durchgeführten Assay als auch durch HPLC/MS-Analyse untersucht. Für das System TycA/(C1)TycB1K9D konnte in Gegenwart der Substrataminosäuren [^{14}C]-LPhe und LPro eine deutliche, im Vergleich zum System TycA/TycB1 aber reduzierte DKP-Bildung beobachtet werden. Die Umsatzraten lagen für das System TycA/TycB1 bei $0,62 \text{ min}^{-1}$, für das System TycA/(C1)TycB1K9D bei $0,38 \text{ min}^{-1}$. Das System TycA/(C1)TycB1 ($k_{\text{obs}} = 0,03 \text{ min}^{-1}$) bestätigte seine Inaktivität hinsichtlich einer DKP-Bildung. Umgekehrt ergab die Auswertung des Systems TycA(B3)/(C1)TycB1K9D ($k_{\text{obs}} = 0,18 \text{ min}^{-1}$) eine deutliche Reduktion der Produktivität im Vergleich zum DKP-produzierenden System TycA(B3)/(C1)TycB1 ($k_{\text{obs}} = 0,54 \text{ min}^{-1}$). Dies spiegelt die Beeinträchtigung der COM-Domäneninteraktion wider (Abb. 5.27).

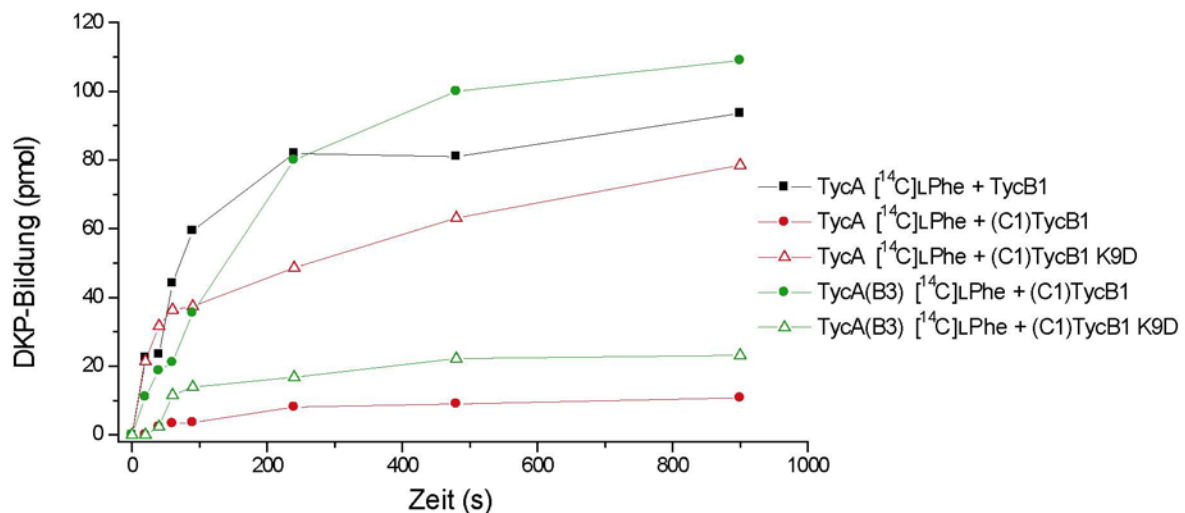


Abb. 5.27: Auswirkung der Mutation K9D auf die COM-Domäneninteraktion. Gezeigt ist der Einfluss der Mutation K9D auf die COM-Domäneninteraktion anhand eines radioaktiven DKP-Bildungsassays. Durch die Mutation von Lysin zu Aspartat in der COM-Domäne von (C1)TycB1 ist das System TycA/(C1)TycB1K9D im Vergleich zum unmutierten System TycA/(C1)TycB1 in der Lage, DKP zu bilden. Umgekehrt wird die Fähigkeit von TycA(B3)/(C1)TycB1 DKP zu bilden durch diese Mutation deutlich reduziert.

Die HPLC-Analyse bestätigte die Ergebnisse des radioaktiven Produktbildungsassays eindeutig. Der für das System TycA/(C1)TycB1K9D nach einer Retentionszeit von 26,1 min detektierte Peak konnte eindeutig einem Massensignal der Größe 245,1 m/z zugeordnet werden. Dies entspricht dem $[M+H]^+$ -Peak des DKPs (MW = 244,1 g/mol). Ebenso konnte in den Systemen TycA/TycB1 und TycA(B3)/(C1)TycB1 bei diesen Retentionszeiten ein Signal identifiziert werden, dass einer Masse von $[M+H]^+ = 245,1$ m/z entspricht. Gleichzeitig wurde deutlich, dass die Produktivität des Systems TycA(B3)/(C1)TycB1K9D deutlich hinter der des Systems TycA(B3)/(C1)TycB1 zurückbleibt (Abb. 5.28).

Zusammenfassend scheint es möglich, durch ortsgerichtete Mutagenese in COM-Domänen aus nativ nichtkompatiblen COM-Domänen korrespondierende Einheiten zu generieren und gleichzeitig die intermolekulare Kommunikation in vormals interagierenden NRP-Systemen nachhaltig zu stören. Dies könnte eine weitere Alternative darstellen, um durch Kombination von Synthetasen aus verschiedenen Biosynthesystemen neue hybride NRP-Systeme zu entwickeln.

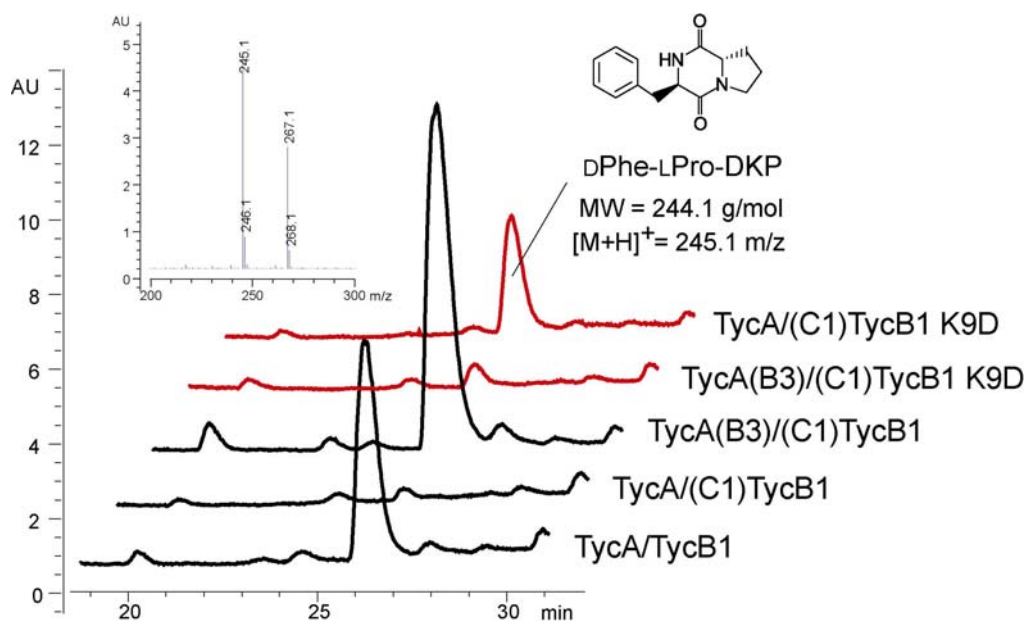


Abb. 5.28: Auswirkung der Mutation K9D auf die DKP-Bildung. Gezeigt ist das Ergebnis DKP-Bildungsassays und die Auswertung der HPLC/MS-Analyse in DKP-bildenden Systemen. Dabei wird deutlich, dass die Mutante im Gegensatz zu (C1)TycB1 in der Lage ist, im System mit TycA DKP zu bilden, mit TycA(B3) beobachtet man im Gegensatz dazu einen deutlichen Abfall.

5.6 Aufbau eines universellen Kommunikationssystems (UKS)

Die bisherigen Untersuchungen der COM-Domänen zeigten, dass diese das entscheidende Kontrollelement für eine selektive, intermolekulare Interaktion zwischen NRPS darstellen. Sie bilden somit die Grundlage für die Weiterreichung von Reaktionsintermediaten zwischen Partner-NRPS innerhalb eines multienzymatischen NRP-Biosynthese-Komplexes und somit auch für die Produktbildung. Voraussetzung für die Etablierung produktiver Wechselwirkungen zwischen Partner-NRPS sind kompatible COM-Domänenpaare, wie sie an den natürlichen Übergängen zwischen zwei Synthetasen eines Biosynthesesystems vorkommen.

Eine Interaktion zwischen Nicht-Partner-NRPS kann durch den Austausch von COM-Domänen und die damit einhergehende Generierung kompatibler COM-Domänenpaare erreicht werden. Kompatible COM-Domänenpaare können auch mit mis-kognaten COM-Domänen gebildet werden, solange die Homologie zwischen den beteiligten kognaten und mis-kognaten COM-Domänen (COM^D - oder COM^A) ausreichend groß ist ($\geq 70\%$). Dies konnte durch den erfolgreichen cross-talk zwischen COM-Domänenpaaren aus verschiedenen NRP-Biosynthesesystemen nachgewiesen werden.

Durch die Generierung von COM-Domänen-Austauschen und –Fusionen ($\text{TycA(A)}\Delta\text{E}$) konnte darüber hinaus ihre Portabilität und ihr biokombinatorische Potential gezeigt werden. Dieses biokombinatorische Potential sollte nachfolgend durch die Etablierung eines universellen NRPS-Kommunikationssystems (UKS) ausgenutzt werden.

An der nichtribosomalen Peptidsynthese sind Initiations-, Elongations- und Terminationsmodule beteiligt. Im Sinne einer „echten“ kombinatorischen Biosynthese müssten alle beteiligten Module idealerweise in der Lage sein, in beliebiger Weise miteinander zu interagieren. Dies würde zur spontanen Bildung zufälliger Biosynthese-Komplexe führen, welche die Synthese unterschiedlichster Peptid-Produkte katalysieren (Abb. 5.29.).

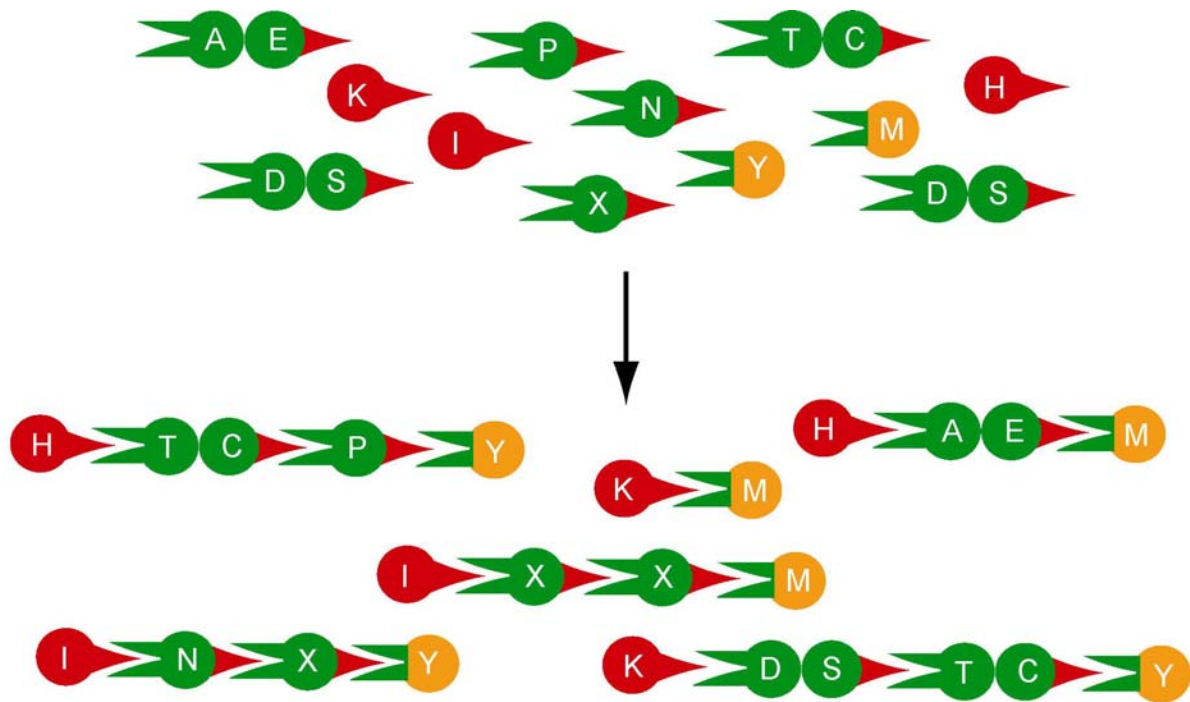


Abb. 5.29: Kombinatorisches Potential des Universellen Kommunikationssystems (UKS). Das UKS besteht aus einem Pool von Initiationsmodulen (rot), Elongationsmodulen (grün) und Terminationsmodulen (orange), die über kompatible Partner-COM-Domänenpaare verfügen und dadurch beliebig kombiniert werden können. Durch Kombination der Synthetasen können Peptide mit unterschiedlicher Länge und Aminosäurefolge synthetisiert werden.

5.6.1 Konstruktion des universellen Kommunikationsvektors

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass das Initiationsmodul TycA in der Lage ist, in Wechselwirkung mit Elongations- (TycB1 und (B1)TycC1) und Terminationsmodulen (SrfAC) zu treten. Grundlage für die Interaktionen sind hierbei kompatible COM-Domänenpaare (kognat: ((A)/(B1) bzw. mis-kognat ((A)/(SrfAC)). Eine kombinatorische Biosynthese (wie oben beschrieben) wird durch die fehlende Interaktion von Elongations- und Terminationsmodul verhindert, was auf das Fehlen einer geeigneten COM^D-Domäne am C-Terminus der verwendeten Elongationsmodule zurückzuführen ist.

Im Folgenden wurde daher ein universeller Klonierungsvektor konstruiert, der folgende Charakteristika aufweist (vgl. Kap. 4.1.1.4): 1) pUKS03 ist ein Derivat des Vektors pTrcHis2-TOPO und trägt die kodierenden Bereiche des COM-Domänenpaares COM(A)/COM(B1) in der Reihenfolge 5'-COM(B1)-COM(A)-3'; 2) die kodierenden Genbereiche sind durch einen 254 bp umfassenden Spacer getrennt, der eine multiple Klonierungsstelle bestehend aus den Restriktionsstellen

*Xba*I, *Bam*HI, *Ban*II, *Kpn*I, *Sac*I, und *Eco*RI enthält; 3) die Klonierung von Genfragmenten über die Restriktionsstellen *Xba*I und *Nhe*I erlaubt eine Fusionierung *in frame* mit den kodierenden Bereichen der COM-Domänen; 4) C-terminal des kodierenden Bereichs der COM(A)-Domäne ist eine für einen Hexahistidin-tag kodierende Sequenz *in frame* lokalisiert, welche die Produktion Hexahistidin getaggtter Proteine ermöglicht (Abb. 5.30).

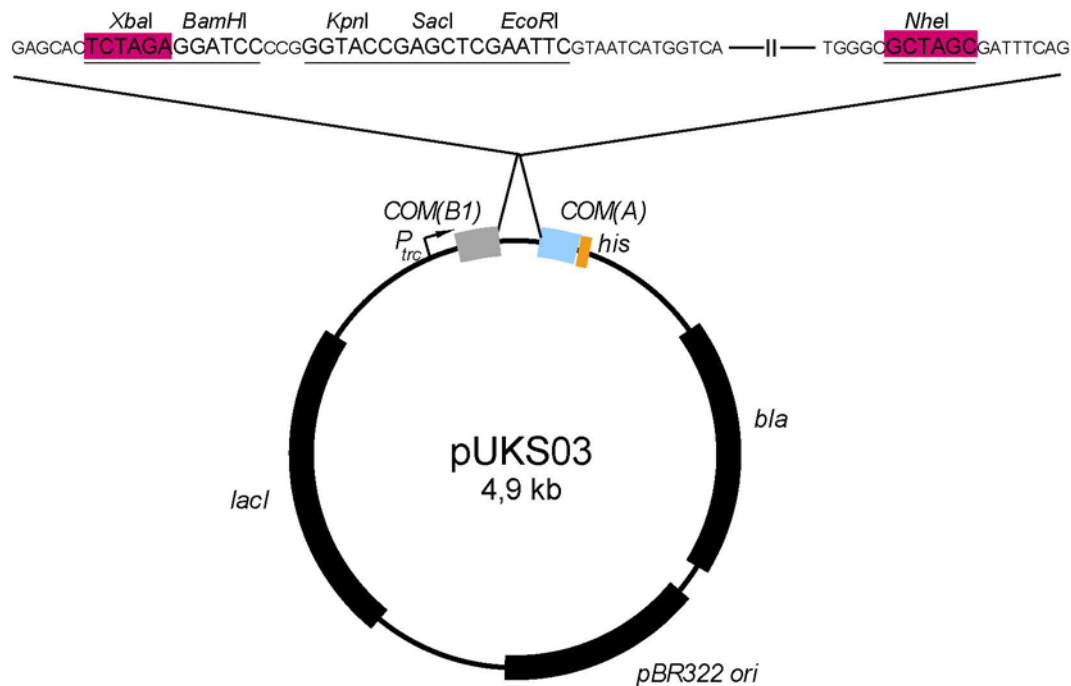


Abb. 5.30: Vektorkarte des universellen Kommunikationsvektors pUKS03. Das 4,9 kb umfassende Plasmid pUKS03 ist ein Derivat des Vektors pTrcHis2-TOPO und enthält die durch einen Spacer getrennten kodierenden Bereiche des COM-Domänenpaares COM(B1) und COM(A). Die Klonierung über *Xba*I und *Nhe*I erlaubt die Fusion *in frame* von Genfragmenten, die für NRP-Synthetasen kodieren, mit den entsprechenden Bereichen der COM-Domänen. C-terminal ist die kodierende Sequenz eines Hexahistidin-tags lokalisiert.

Aufgrund der gestellten Vorgaben sollte die Expression von klonierten Genfragmente zur Produktion von NRPS-Elongationsmodulen führen, welche am N-Terminus mit der COM^A-Domäne von TycB1 und am C-Terminus mit der COM^D-Domäne von TycA fusioniert sind. Basierend auf in dieser Arbeit bislang gewonnenen Erkenntnisse sollten die entsprechenden Hybrid-Elongationsmodule in der Lage sein (i) mit dem Initiationsmodul TycA, (ii) mit dem Terminationsmodul SrfAC, sowie (iii) mit sich selbst und (iv) untereinander zu interagieren. Aufgrund der zusätzlichen Fusion eines C-terminalen His₆-tags wird darüber hinaus eine einfache affinitätschromatographische Reinigung der rekombinanten Enzyme gewährleistet.

5.6.2 Konstruktion und biochemische Charakterisierung eines Elongationsmoduls für das Universelle Kommunikationsmodell

Um die Praktikabilität des UKS unter Beweis zu stellen, sollte das System und der konstruierte Vektor einem „*proof-of-concept*“ unterzogen werden. Als Elongationssynthetase wurde hierfür das zweite Modul der Bacitracin-Synthetase (BacB2) ausgewählt.

Die Gründe für diese Wahl waren, dass aufgrund der Domänenorganisation C-A-PCP-E von BacB2 dem natürlichen Umfeld der fusionierten COM-Domänen Rechnung getragen wird, da COM(B1) einer C-Domäne vorgelagert ist und COM(A) sich stromabwärts an eine E-Domäne anschließt. Zudem erlaubt die Wahl von Modulen, die gegenüber den verwendeten Initiations- und Terminationssynthetasen unterschiedliche Substrataminosäuren aktivieren (BacB2 aktiviert die basische Aminosäure Ornithin), dass sich die Reaktionen besser verfolgen lassen und sich eindeutig den Aktivitäten bestimmter Enzyme zuordnen lassen. Damit lässt sich gleichzeitig eine größere Produktvielfalt erzielen. Weiterhin wird mit der Wahl des Bacitracin-Biosynthesystems die universelle Einsatzmöglichkeit der COM-Domänen untermauert.

Nach der Amplifizierung des kodierenden Genbereichs von BacB2 aus chromosomaler DNA des Bacitracin-Produzentenstammes *B. licheniformis* ATCC 10716 wurde dieser mit *NheI* und *AvrII* geschnitten und über die kompatiblen Schnittstellen *XbaI* und *NheI* ungerichtet in den pUKS03-Vektor ligiert. Damit wurde die *in frame* Fusion mit den kodierenden Bereichen der COM-Domänen sichergestellt. Das gebildete Plasmid wurde als pUKS-(B1)*bacB2(A)* bezeichnet (Abb. 5.31). Die Produktion des rekombinanten Enzyms erfolgte heterolog in *E. coli* M15(pRep4). Durch anschließende Ni²⁺-Affinitätschromatographie konnte das Protein (B1)BacB2(A) annähernd zur Homogenität gereinigt werden.

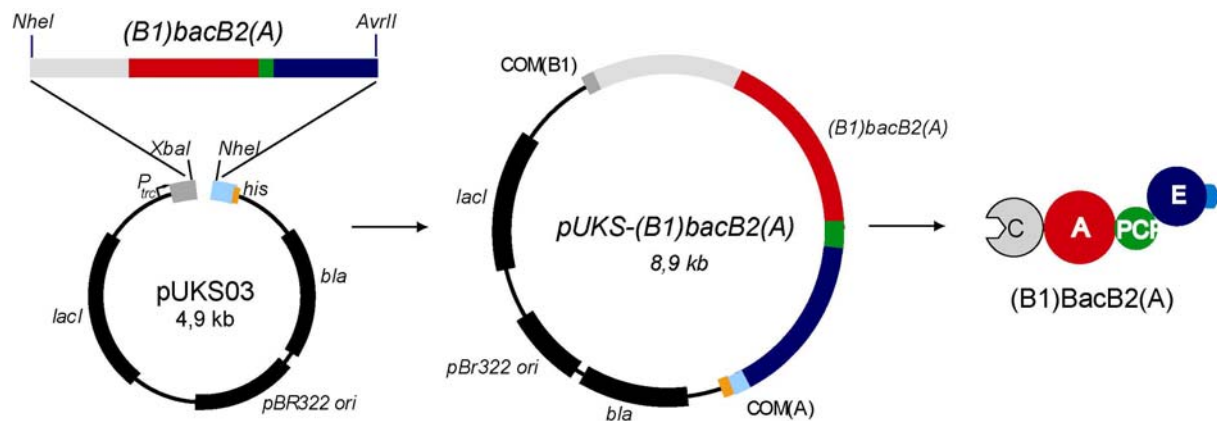


Abb. 5.31: Konstruktion des Elongationsplasmids *pUKS-(B1)bacB2(A)*. Der kodierende DNA-Bereich von BacB2 (Domänenfolge C-A-PCP-E) wird über die Schnittstellen *NheI*/*AvrII* in den mit *XbaI*/*NheI* geschnittenen Vektor *pUKS03* kloniert. Dadurch wird die *in frame* Fusionierung mit den kodierenden Bereichen der COM-Domänen sichergestellt. Es entsteht das Plasmid *pUKS-(B1)bacB2(A)*. Transformation mit *E. coli* M15(*pRep4*)-Zellen erlaubt anschließend die heterologe Produktion des Enzyms *(B1)BacB2(A)*.

Im Anschluss wurde die katalytische Aktivität der A- und PCP-Domäne durch ATP-PP_i-Austauschreaktion bzw. in einem Beladungsassay überprüft (Abb. 5.32). Die Analyse ergab, dass das Enzym *(B1)BacB2(A)* in der Lage war, die Substrataminosäure LOrn zu aktivieren und die PCP-Domäne zu 21% mit [¹⁴C]-LOrn zu beladen. Damit stand es als potientes Elongationsmodul für Produktbildungsassays innerhalb des Universellen Kommunikationssystems zur Verfügung.

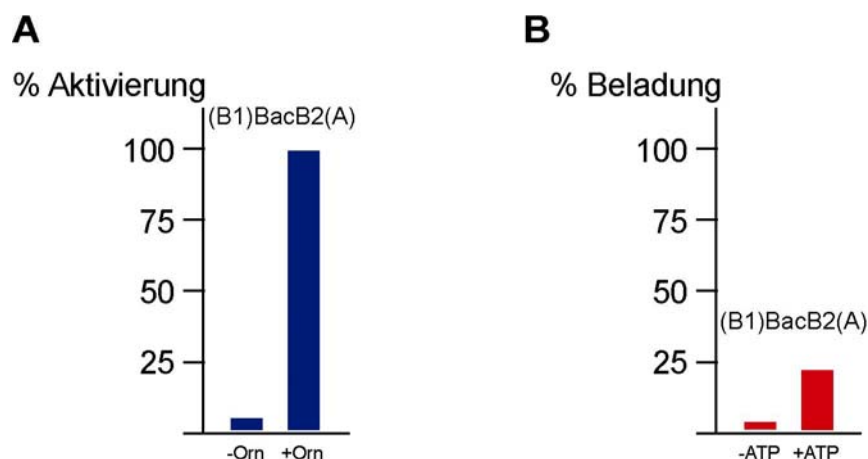


Abb. 5.32: Ergebnis der Adenylierungs- und Beladungsreaktion von *(B1)BacB2(A)*. Das Elongationsmodul *(B1)BacB2(A)* ist in der Lage, die Substrataminosäure LOrn zu aktivieren (A) und die PCP-Domäne zu 22% zu beladen (B).

5.6.3 Produktbildung im Universellen Kommunikationssystem

Das Universelle Kommunikationssystem setzt sich aus Modulen zusammen, die an ihren Termini kompatible COM-Domänen besitzen. Durch Verwendung des Partner-COM-Domänenpaares COM(A)/COM(B1) der Tyrocidinsynthetasen TycA bzw. TycB1 wird die intermolekulare Kommunikation zwischen den Reaktionspartnern, dem Initiationsmodul TycA, dem Elongationsmodul (B1)BacB2(A) und dem Terminationsmodul SrfAC generell ermöglicht. Eine weitere Voraussetzung für die Produktbildung ist die Berücksichtigung der Stereoselektivität in der Donor-Position der beteiligten C-Domänen.

Im vorliegenden Fall akzeptiert die C-Domäne des Elongationsmoduls (B1)BacB2(A) L-konfigurierte Aminosäuren. Eine solche L-Aminosäure wird durch das Initiationsmodul TycA(A) Δ E (Domänenfolge A-PCP-COM(A)) bereitgestellt. Die C-Domäne des Elongationsmoduls (B1)BacB2(A) reicht ihrerseits D-konfiguriertes Ornithin an das Terminationsmodul weiter, welches von SrfAC akzeptiert und prozessiert werden kann.

Aufgrund der im UKS gemachten Annahmen sollten die einzelständigen Enzymen TycA(A) Δ E (Initiation), (B1)BacB2(A) (Elongation) und SrfAC (Termination) in der Lage sein folgende Biosynthese-Komplexe und Peptidprodukte zu bilden:

- (i) TycA(A) Δ E / SrfAC: LPhe-LLeu,
- (ii) TycA(A) Δ E / (B1)BacB2(A) / SrfAC: LPhe-DOrn-LLeu,

Das im erstgenannten Beispiel genannte Produkt sollte jedoch nur beobachtet werden, wenn die C-Domäne des Terminationsmoduls SrfAC eine ausreichend hohe Nebenspezifität für L-konfigurierte Akzeptor-Substrate besitzt. Genauere Erkenntnisse hierüber waren in der Literatur nicht bekannt.

Um die Bildung der entsprechenden Biosynthese-Komplexe und –Produkte zu untersuchen, wurden Produktbildungsassays in Gegenwart aller Enzyme und der entsprechenden Substrataminosäuren LPhe, LOrn und LLeu durchgeführt und mittels HPLC/MS analysiert (Abb. 5.33). Das Ergebnis zeigte, dass dieses System tatsächlich in der Lage war, das erwartet Tripeptid LPhe-DOrn-LLeu zu produzieren. Das konnte durch ein entsprechendes Massensignal von $[M+H]^+ = 393,1$ m/z (erwartete Masse 393 m/z) bei einer Retentionszeit von 21,8 min nachgewiesen werden. Daneben wurde nach einer Reaktionszeit von 20 h auch die Bildung des Dipeptids LPhe-LLeu beobachtet ($[M+H]^+ = 279,1$ m/z erwartete Masse 279 m/z,

Retentionszeit 26,1 min). Dies lässt sich damit erklären, dass die C-Domäne des Terminationsmoduls SrfAC keine ausschließliche Selektivität für eine D-konfigurierte Aminosäure besitzt, sondern auch in gewissem Umfang L-konfigurierte Aminosäuren toleriert. Eine schwache Seitenspezifität für L-konfigurierte Akzeptor-Substrate wurde - insbesondere nach langen Inkubationszeiten - auch für die eigentlich D-selektive C-Domäne von TycB1 beobachtet [Stachelhaus et al., 2000]. Die Bildung eines zyklischen Tripeptids LPhe-DOrn-LLeu_(zyk), welches durch intramolekularen Angriff der ϵ -Aminogruppe der Ornithinseitengruppe auf die α -Carbonylfunktion gebildet werden könnte, wurde hingegen nicht beobachtet.

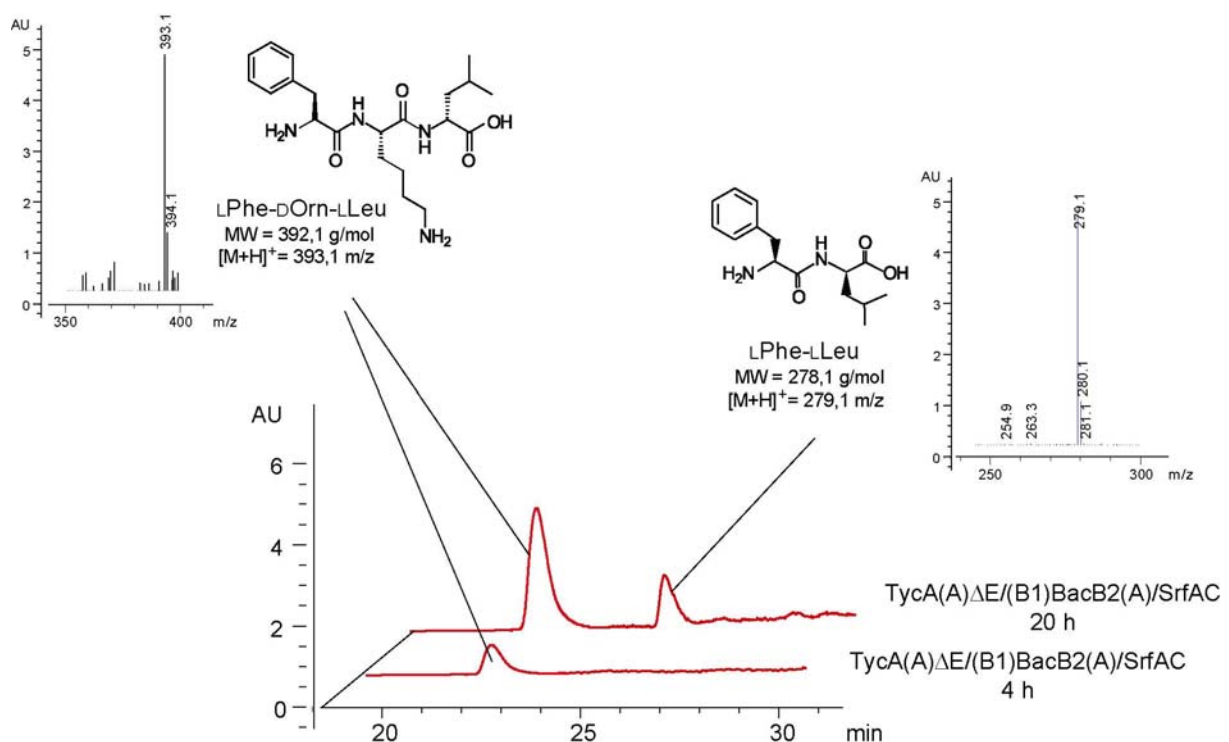


Abb. 5.33: Produktbildung im Universellen Kommunikationssystem. Das aus dem Initiationsenzym TycA(A) Δ E, dem Elongationsenzym (B1)BacB2(A) und dem Terminationsenzym SrfAC bestehende System war in Gegenwart der Substrataminosäuren LPhe, LOrn und LLeu in der Lage, das erwartete Tripeptid LPhe-DOrn-LLeu zu bilden ($[M+H]^+ = 393,1$ m/z, erwartete Masse 393 m/z, Retentionszeit 21,8 min). Dadurch wurde die Fähigkeit der eingesetzten Enzyme zur intermolekularen Kommunikation bestätigt. Bei einer Reaktionsdauer von 20 h konnte zusätzlich das Dipeptid LPhe-LLeu ($[M+H]^+ = 279,1$ m/z erwartete Masse 279 m/z, Retentionszeit 26,1 min) detektiert werden. Dies kann durch eine verringerte Stereoselektivität seitens der C-Domäne von SrfAC erklärt werden.

Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll, dass das Elongationsmodul (B1)BacB2(A), welches mit Hilfe des Universellen Kommunikationsvektors generiert wurde, in der Lage ist, mit dem Initiationsenzym und dem Terminationsenzym SrfAC eine intermolekulare Kommunikation einzugehen und daraus resultierend das

erwartete Tripeptid zu bilden. Gleichzeitig stellt der erfolgreiche Einsatz einer dem Bacitracin-Biosynthesystem entnommenen Synthetase eine Erweiterung des COM-Domänenansatzes dar.

Alle Ergebnisse zusammengekommen haben gezeigt, dass Synthetasen aus verschiedenen Biosynthesystemen unter Verwendung kompatibler Partner-COM-Domänenpaare und unter Beachtung der Stereoselektivität der C-Domäne des Akzeptorpartners zu einer selektiven intermolekularen Interaktion und zur Produktbildung fähig sind. Die Identifizierung der COM-Domänen und ihre bisher gezeigten Eigenschaften machen sie so zu einem wichtigen und leistungsstarken Werkzeug für die Generierung neuer artifizieller Biosynthese-Komplexe und die biokombinatorische Synthese von Naturstoff-Derivaten.

6 DISKUSSION

Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) katalysieren die Produktion von strukturell und funktionell komplexen Naturstoffen. Aufgrund ihres modularen Aufbaus besitzen sie ein enormes Potential für die biokombinatorische Synthese neuartiger, pharmakologisch-relevanter Peptide. In den letzten Jahren konnten in diesem Zusammenhang die Voraussetzungen für die erfolgreiche Manipulation von NRPS und die Generierung funktioneller Hybridsynthetasen geschaffen werden. Ausgangspunkt für die hierbei entwickelten Verfahren waren insbesondere die gewonnenen Erkenntnisse über die intramolekulare Interaktion/Kommunikation zwischen Aminosäure aktivierenden Modulen [Doekel et al., 2000; Mootz et al., 2000; Linne et al., 2001; Dürfahrt et al., 2003].

Gänzlich unverstanden blieben bei all diesen Untersuchungen jedoch die Grundlagen der intermolekularen Kommunikation. Die hier gemeinte produktive Interaktion zwischen Partner-NRPS muss äußerst spezifisch sein, um beim Zusammenspiel mehrerer Synthetasen innerhalb eines multienzymatischen Biosynthese-Komplexes die definierte Synthese des gewünschten Peptid-Produktes sicherzustellen. Da in natürlichen Systemen keine Wechselwirkungen zwischen Nichtpartner-NRPS vorkommen, wurde vermutet, dass die intermolekulare Kommunikation zwischen Synthetasen durch spezifische Erkennungsmechanismen gesteuert wird. Nur mit Hilfe solcher Mechanismen ist es möglich, die selektive Interaktion zwischen Partner-NRPS zu fördern und gleichzeitig eine unspezifische Interaktion zwischen Nichtpartner-NRPS zu unterbinden. Die molekulare Basis der Protein-Protein-Kommunikation zwischen NRPS ist daher für das Verständnis der spezifischen Synthese eines Naturstoffes, aber auch für die Syntheseplanung zur Generierung neuer hybrider Biosynthesesysteme von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die molekulare Grundlage für die selektive intermolekulare Interaktion zwischen NRPS untersucht werden. Dies führte zur Identifizierung Kommunikations-vermittelnder Domänen (COM-Domänen), die als kompatible Paare an den C- bzw. N-Terminis von Partner-NRPS lokalisiert sind. Das universelle Auftreten von COM-Domänen und ihre Portabilität wurden in unterschiedlichen Experimenten nachgewiesen. Hierdurch wurde die Möglichkeit für die Etablierung eines universellen Kommunikationssystems geschaffen, welches die Basis eines biokombinatorischen Ansatzes zur Peptidsynthese bildet.

6.1 Identifikation von NRPS COM-Domänen

Erste Untersuchungen über die molekularen Grundlagen der selektiven Interaktion zwischen NRPSs wurden zunächst am Initiationsmodul TycA (bekannte Domänenorganisation: A_{Phe}-PCP-E) durchgeführt. TycA interagiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit seinem natürlichen Partner, dem Elongationsmodul TycB1. Diese Wechselwirkung führt in Gegenwart aller Substrate zur Synthese des Dipeptids D_{Phe}-L_{Pro}S-P_{pant}, welches autokatalytisch unter Bildung des zyklischen Diketopiperazins (DKP) von TycB1 abgespalten wird.

Innerhalb der C-terminalen Hälfte (ca. 480 AS) von TycA ist die E-Domäne lokalisiert, die aufgrund ihrer Homologie zu NRPS-C-Domänen eine Größe von ca. 450 Aminosäuren besitzt und direkt an die assoziierte PCP-Domäne angrenzt. Eine fehlende Aktivität dieser E-Domäne (z.B. durch Punktmutation im aktiven Zentrum) konnte im Produktbildungsassay mit TycB1 durch die Bereitstellung des entsprechenden D-konfigurierten Substrates D_{Phe} kompensiert werden. Eine vollständige Deletion der C-terminalen Hälfte führte hingegen zu einem Ausbleiben der Produktbildung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die physische Präsenz des C-Terminus von TycA essentiell für die produktive Interaktion mit TycB1 ist und eine Brückenfunktion zwischen TycA und TycB1 übernimmt. Für die Bildung des heterodimeren Komplexes werden möglicherweise insbesondere die ca. 30 C-terminalen Aminosäure-Reste benötigt, die aufgrund von Sequenz-Vergleichen nicht der E-Domäne zugeordnet werden können.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Deletionsmutanten des Initiationsmoduls generiert, wobei die drei bis 23 C-terminalen Aminosäure-Reste von TycA deletiert wurden. In unterschiedlichen biochemischen Tests konnte gezeigt werden, dass die bekannten Aktivitäten von TycA (Substrat-Adenylierung, -Thiolierung und -Epimerisierung) durch den Wegfall C-terminaler Reste nicht beeinträchtigt wurden. Selbst die E-Domäne behielt nach Deletion der 23 C-terminalen Aminosäuren ihre volle Aktivität. Ein vollkommen anderes Bild ergab sich jedoch für die Untersuchung der Deletionsmutanten in Produktbildungsassays mit dem Elongationsmodul TycB1. Die DKP-Bildung wurde hier bereits durch die Deletion der drei C-terminalen Aminosäure-Reste von TycA signifikant beeinträchtigt (TycA Δ 03/TycB1: $k_{obs} = 0,54 \text{ min}^{-1}$; Wildtyp-System TycA/TycB1: $k_{obs} = 0,94 \text{ min}^{-1}$), während die Deletion weiterer drei Aminosäuren (TycA Δ 06/TycB1) zu einer

vollständigen Unterbindung der Produktbildung führte. Diese Ergebnisse deuteten an, dass der äußerste C-Terminus von TycA (ca. 23 AS) eine kommunikationsvermittelnde Aktivität besitzt. Aufgrund dessen wurde dieser Bereich nachfolgend (zunächst als Arbeitshypothese) als Kommunikations-vermittelnde (*communication-mediating*; COM) Domäne bezeichnet.

Basierend auf der Identifizierung einer putativen COM-Domäne (COM^D) am C-Terminus des Donor-Enzyms TycA stellte sich natürlich unmittelbar die Frage nach einer Partner-COM-Domäne am N-Terminus des Akzeptorenzyms TycB1 (bekannte Domänenorganisation: C-A_{Pro}-PCP). Leider konnte zur Identifizierung dieser putativen Akzeptor-COM-Domäne (COM^A) keine einfache Deletionsanalyse des N-Terminus von TycB1 durchgeführt werden, da abgesehen von einem Produktbildungsassay keine geeignete Methode zur Bestimmung der C-Domänenaktivität zur Verfügung stand. Im Falle des Ausbleibens einer Produktbildung mit TycA könnte folglich nicht unterschieden werden, ob dieses Defizit auf die Unterbrechung der Protein-Protein-Kommunikation zwischen TycA und TycB1 oder die Inaktivierung der C-Domäne von TycB1 zurückzuführen wäre. Folglich musste ein alternativer Weg beschritten werden.

Ausgangspunkt für die Identifizierung von COM^A-Domänen bildete zunächst ein Vergleich der Primärstrukturen von NRPS an den Übergängen TycA/TycB1 und TycB3/TycC1 (Abb. 6.1).

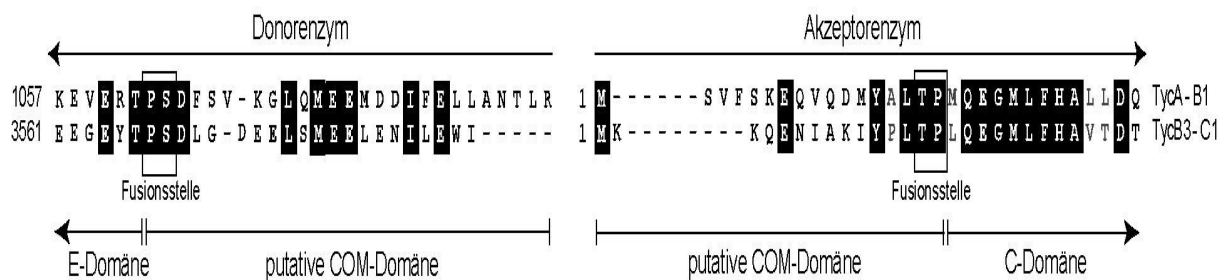


Abb. 6.1: Sequenz-Alignment der Donor-COM-Domänen TycA und TycB3 sowie der AkzeptorCOM-Domänen TycB1 und TycC1. Dargestellt ist der Übergang zwischen TycA und TycB1 bzw. TycB3 und TycC1 wobei nur jeweils die C-terminalen Aminosäurereste der Donorenzyme und die N-terminalen Aminosäure-Reste der korrespondierenden Akzeptorenzyme gezeigt sind. Invariante Aminosäurereste sind durch schwarze Boxen markiert. Es ergibt sich eine Homologie zwischen den COM-Domänen von TycA und TycB3 von 32% und zwischen TycB1 und TycC1 bei 37%.

Basierend auf den Ergebnissen der TycA-Deletionsstudien wurde das hochkonservierte Sequenzmotiv TPSD (24 AS vor dem C-Terminus von TycA) als Schnittstelle zwischen E- und putativen COM^D-Domänen definiert. Unter der

Annahme, dass putative Akzeptor-COM-Domänen eine vergleichbare Größe besitzen, wurde das hoch-konservierte Sequenzmotiv L(T/S)P(M/L)QEG (als Schnittstelle zwischen putativen COM^A- und C-Domänen festgesetzt. Nachfolgend wurden durch Austausch ihrer putativen COM-Domänen chimäre Derivate der Donorenzyme TycA und TycB3 (TycA(B3) und TycB3(A)) und der Akzeptorenzyme TycB1 und TycC1 ((C1)TycB1 und (B1)TycC1) generiert.

Alle 16 möglichen Kombinationen zwischen Donor- und Akzeptorenzymen wurden nachfolgend im Hinblick auf Ihre Fähigkeit zur Produktbildung (als indirekter Hinweis auf die spezifische Interaktion der NRPS) untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Kommunikation zwischen natürlichen Partner-NRPS (TycA/TycB1 bzw. TycB3/TycC1), durch den Austausch jeweils einer COM-Domäne (COM^D oder COM^A) vollständig unterbunden werden kann (z.B. TycA/(C1)TycB1 oder TycB3(A)/TycC1). Durch den Austausch auch der zweiten COM-Domäne konnte dieses Defizit wieder überwunden werden (*gain-of-function*; z.B. in TycA(B3)/(C1)TycB1). Offensichtlich bilden COM-Domänen (COM^D und COM^A) an der Interaktionsfläche zwischen zwei Partner-NRPS ein kompatibles COM-Domänenpaar (z.B. (A)/(B1) oder (B3)/(C1)), die als solches notwendig und hinreichend für die Etablierung einer produktiven Protein-Protein-Interaktion sind. Besonders eindrucksvoll wird dieser Befund dadurch dokumentiert, dass durch die Verwendung eines kompatiblen COM-Domänenpaares die Kommunikation zwischen Nichtpartner-NRPS erzwungen werden kann (z.B. TycA/(B1)TycC1 bzw. TycB3(A)/TycB1). In gleicher Weise kann durch die Verwendung nicht-kompatibler COM-Domänen die natürliche Wechselwirkung zwischen Partner-NRPS unterbunden werden.

Die Untersuchung der Produktbildungsraten für die Partner-NRPS TycA/TycB1 zeigte, dass die Verwendung unterschiedlicher kompatibler COM-Domänenpaare quasi keinen Einfluss auf die Effizienz der getesteten Systeme hatte (TycA/TycB1: $k_{obs} = 0,62 \text{ min}^{-1}$; TycA(B3)/(C1)TycB1: $k_{obs} = 0,59 \text{ min}^{-1}$). Bei der erzwungenen Kommunikation zweier Nichtpartner-NRPS konnte hingegen bei der Verwendung der gleichen, kompatiblen COM-Domänenpaare ein geringer, aber dennoch signifikanter Abfall der Produktbildungsrate beobachtet werden (TycB3(A)/TycB1: $k_{obs} = 0,38 \text{ min}^{-1}$). Dies könnte darauf hindeuten, dass auch der Rest der Donorenzyme (ca. 1070 AS) einen Einfluss auf die Effizienz der intermolekularen Interaktion mit dem Akzeptorenzym besitzen.

Um den Einfluss der E-Domäne von TycA auf die intermolekulare Interaktion mit TycB1 zu untersuchen, wurde das artifizielle NRPS TycA(A) Δ E konstruiert. Bei diesem TycA-Derivat wurde die E-Domäne deletiert und die N-terminalen Hälfte (bestehend aus A- und PCP-Domäne) direkt mit der kognaten COM^D-Domäne fusioniert. Die artifizielle NRPS war aufgrund des Fehlens der E-Domäne natürlich nicht mehr in der Lage, die Substrat-Aminosäure Phe von der L- in die D-Konfiguration zu überführen. Entsprechend konnte im Produktassay mit TycB1 aufgrund der Stereoselektivität der beteiligten C-Domäne auch nur durch Bereitstellung der bereits D-konfigurierten Aminosäure eine entsprechende DKP-Bildung beobachtet werden. Die Produktbildungsrate lag hierbei auf dem Niveau des Wildtyp-Systems TycA/TycB1. Dies zeigt, dass die E-Domäne von TycA keinen Beitrag zur Protein-Protein-Kommunikation mit TycB1 leistet, sondern diese vielmehr von der Präsenz eines kompatiblen COM-Domänenpaares abhängt. Darüber hinaus stellt das artifizielle System TycA(A) Δ E/TycB1 eindrucksvoll die für biokombinatorische Anwendungen bedeutende Portabilität von COM-Domänen unter Beweis. Im Gegensatz zu E- oder Te-Domänen, die ihre volle Aktivität nur in Gegenwart ihrer natürlich benachbarten PCP-Domänen entfalten [Linne et al., 2001; Dürfahrt et al., 2003], ist die Aktivität von COM-Domänen offensichtlich unabhängig von benachbarten Domänen.

Die gezeigten Ergebnisse (i) bestätigten die Existenz von COM^D-Domänen am C-Terminus von Donor-NRPS, (ii) führten zur Identifikation von COM^A-Domänen am N-Terminus von Akzeptor-NRPS, (iii) deuteten das universelle Auftreten von kompatiblen COM-Domänenpaaren an den intermolekularen Schnittstellen zwischen Partner-NRPS an und (iv) stellten die aus biokombinatorischer Sicht wichtige Portabilität von COM-Domänen unter Beweis.

6.2 Universalität von COM-Domänen

In Abschnitt 6.1 konnte an verschiedenen Beispielen gezeigt werden, dass kompatible COM-Domänenpaare essentiell für die Etablierung produktiver Protein-Protein-Interaktionen zwischen NRPSs sind. Die gezeigten Beispiele beschränkten sich auf Untersuchungen von Modellsystemen, die sich aus dem Tyrocidin-Biosynthese-Komplex ableiten. Nachfolgend sollte daher das universelle Auftreten von COM-Domänen verifiziert und ihre Existenz in unterschiedlichsten,

multienzymatischen NRP-Biosynthese-Systemen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die Primärstrukturen von NRPSs aus verschiedenen bakteriellen NRP-Systemen an den intermolekularen Übergängen zwischen E und C-Domänen analysiert. Die Sequenzvergleiche zeigten, dass die bereits für das Tyrocidin-Biosynthese-System ermittelten, hoch-konservierten Sequenzmotive TPSD (Donor-Seite) und L(T/S)P(M/L)QEG (Akzeptor-Seite) in allen untersuchten Biosynthese-Systemen anzutreffen waren (Abb. 5.20). Anhand der genannten hoch-konservierten Sequenz-Motive war es daher möglich, die Bereiche putativer COM-Domänen auch in allen anderen untersuchten NRP-Biosynthese-Systemen zu determinieren.

6.2.1 Homologie und Crosstalk

Der *in silico*-Nachweis von putativen COM-Domänen in unterschiedlichen multienzymatischen NRP-Biosynthese-Systemen ist natürlich kein ausreichender Beweis für deren Kommunikations-vermittelnden Aktivität. Dieser Nachweis wurde daher an zwei Beispielen (i) durch die Vorhersage der Protein-Protein-Kommunikation zwischen NRPS verschiedener NRP-Biosynthese-Systeme (crosstalk) und (ii) der nachfolgenden experimentellen Überprüfung dieser Prognosen erbracht.

Ausgangspunkt für diese Untersuchungen bildete das in früheren Arbeiten gewonnene Wissen, dass GrsA (Initiationsmodul des Gramicidin S-Biosynthese-Systems; Domänenorganisation: A_{Phe}-PCP-E) das homologe Donorenzym TycA bei der Initiation der Tyrocidin-Biosynthese ersetzen kann. Dies zeigt, dass GrsA und TycB1 in produktive Interaktion miteinander treten und ihre COM-Domänen ein kompatibles (wenn auch mis-kognates) COM-Domänenpaar bilden können. In der Tat zeigt eine genauere Analyse, dass die kognate COM-Domäne von TycA und die mis-kognate COM-Domäne von GrsA erstaunliche 83% Homologie besitzen (zum Vergleich: die Homologie zwischen den COM-Domänen von TycA und TycB3 beträgt lediglich 32%). Offensichtlich reicht dieses hohe Maß an Homologie zwischen den COM-Domänen aus, damit sich die beiden Donorenzyme GrsA und TycA – wie in zahlreichen Studien gezeigt – funktionell ersetzen können.

Interessanterweise zeigt die *in silico*-Analyse von COM-Domänen (Abb. 6.2), dass auch die COM^A-Domänen der Akzeptor-Module TycB1 und SrfAC eine ausgeprägte Homologie von 88% aufweisen. Da die kognaten COM-Domänen von

TycA und TycB1 ein kompatibles COM-Domänenpaar bilden (→ sprich: miteinander interagieren), sollte gleiches für die mis-kognaten COM-Domänenpaare TycA/SrfAC und GrsA/SrfAC gelten. Tatsächlich konnte mit beiden chimären NRPS-Systemen die Bildung des erwarteten Produktes DPhe-LLeu und damit ein cross-talk zwischen Tyrocidin- und Surfactin- bzw. Gramacidin S- und Surfactin-Biosynthese-System beobachtet werden.

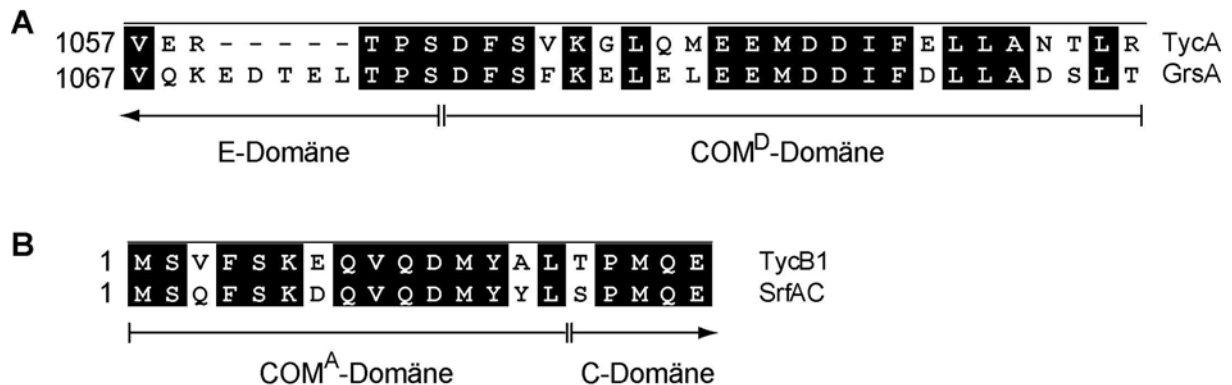


Abb. 6.2: Sequenzvergleich der COM-Domänen zwischen GrsA/TycA bzw. SrfAC/TycB1. Gezeigt sind der C-Terminus von TycA und GrsA (A) bzw. der N-Terminus von TycB1 und SrfAC (B). Auffällig ist die hohe Identität bzw. Homologie innerhalb der COM^D-Domänen bzw. COM^A-Domänen. Sie beträgt in beiden Fällen über 80 %. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

Diese Studien (i) bestätigten das universelle Auftreten von COM-Domänen in multienzymatischen NRP-Biosynthese-Komplexen, (ii) zeigten, dass kompatible COM-Domänenpaare ausgenutzt werden können um einen cross-talk zwischen NRP-Biosynthese-Systemen zu etablieren und (iii) offenbarten, dass die COM-Domänen der kognaten und mis-kognaten NRPS nicht notwendigerweise identisch sein müssen, sondern dass ein ausreichend hohes Maß an Homologie (>80%) auszureichen scheint.

6.2.2 Strukturelle Analyse von COM-Domänen

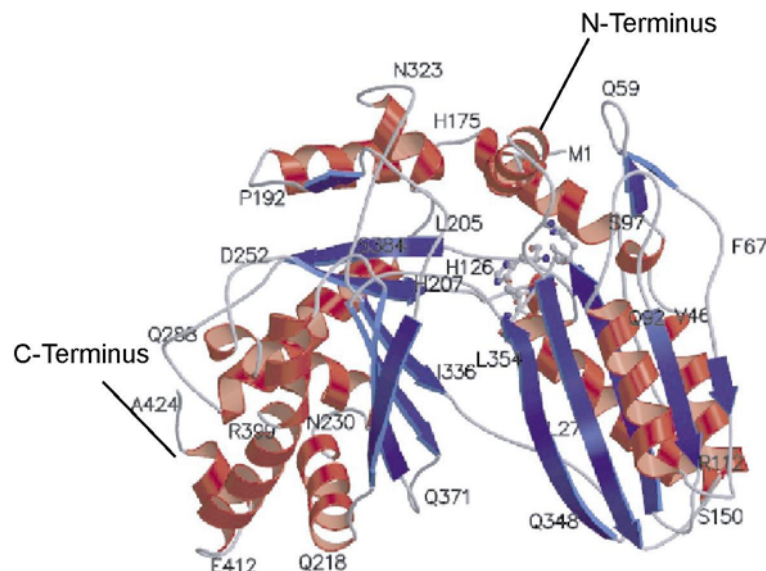
Wie in Abb. 5.20 gezeigt, konnten die putativen COM-Domänen unterschiedlichster multienzymatischer NRP-Biosynthese-Systeme durch Sequenzvergleiche determiniert werden. Die hierbei ermittelten COM-Domänen besitzen eine Größe von 10 bis 30 Aminosäuren und zeigen untereinander im Allgemeinen nur geringe Sequenzhomologien (Ausnahmen: s. 6.2.1). Lohnenswert ist jedoch ein Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung und der pI-Werte von

vollständigen NRPS und ihren COM-Domänen, wobei für die nachfolgende Betrachtung alle Synthetasen des Gramicidin S (GrsAB), Surfactin (SrfA-ABC) und Tyrocidin (TycABC) Biosynthese-Komplexes und ihre jeweiligen COM-Domänen berücksichtigt wurden. Diese Analyse zeigte, dass der mittlere pI von vollständigen NRPS bei $5,2 \pm 0,2$ liegt. Im Vergleich hierzu liegt der mittlere pI-Wert von COM^D-Domänen bei $3,3 \pm 0,2$ und von COM^A-Domänen bei $6,6 \pm 0,8$. Der niedrige pI-Wert von COM^D-Domänen kann hierbei direkt mit dem überproportional hohen Auftreten von aciden Aminosäure-resten korreliert werden (COM^D: $33 \pm 2\%$; NRPS: $14 \pm 1\%$). Beide Befunde könnten darauf hindeuten, dass die Interaktionen zwischen kompatiblen COM-Domänen-Paaren vorrangig über polare und/oder elektrostatische Wechselwirkungen etabliert werden.

Die Vermittlung der Protein-Protein-Interaktion über polare oder geladene Kontaktflächen deutet gewöhnlich auf transiente (sprich: schwache und kurzlebige) Wechselwirkungen hin, während stabile (sprich: starke und dauerhafte) Kontakte über hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt werden. Interessanterweise deuten *in vitro* und Untersuchungen am System TycA/TycB1 in der Tat auf eine eher transiente Wechselwirkung beider Partner-NRPS hin. Im genannten System erfolgte die Produktbildung am effektivsten, wenn das Akzeptorenzym TycB1 im Überschuss gegenüber dem Donorenzym vorlag. Im konkreten Falle betrug das Idealverhältnis zwischen Donor und Akzeptor 1:25 [Gruenewald et al., 2004]. Über die Dynamik der Assoziation/Dissoziation zweier NRPS ist bislang wenig bekannt. Dennoch kann natürlich darüber spekuliert werden, dass es nach der Interaktion der COM-Domänen aufgrund der Translokationsreaktion zu einer Konformationsänderung innerhalb des Komplexes kommt, welche dessen Dissoziation begünstigt:

Zur Knüpfung der Peptidbindung, wird das am 4'-Ppant-Kofaktor des Donorenzyms gebundene Aminoacyl- bzw. Peptidylintermediat in die Donorposition der C-Domäne positioniert, während die Akzeptorposition mit dem Aminoacyl-Ppant-Intermediates der Akzeptorsynthetase belegt ist. Nach der erfolgreichen Knüpfung der Peptidbindung, wird das um eine Aminoacyl-Einheit verlängerte und am 4'-Ppant-Kofaktor des Akzeptorenzyms gebundene Peptidyl-Intermediat für eine weitere Kettenverlängerung zur stromabwärts gelegenen C-Domäne weitergereicht. Das hierbei erforderliche Umlappen des Kofaktors während der Translokation könnte zu einer Konformationsänderung führen, welche die Dissoziation der Synthetasen zur Folge hat.

Unabhängig von Primärstruktur und Ladung, setzt die selektive Vermittlung der intermolekularen Protein-Protein-Kommunikation auch das Vorhandensein definierter Sekundärstrukturen der COM-Domänen voraus. Leider ist auf struktureller Ebene über die Termini von Akzeptor- und Donor-NRPS nur wenig bekannt. Eine Ausnahme bildet das Protein VibH aus dem Vibriobactin-Biosynthesesystem, welches eine einzelständige NRPS C-Domäne darstellt und dessen Kristallstruktur kürzlich gelöst werden konnte (Abb. 6.3) [Keating et al., 2002]. VibH ist im Biosynthese-Komplex von Vibriobactin zwischen den NRPSs VibB und VibF lokalisiert und sollte von daher über seinen N- und C-Terminus – putativ über dort befindliche COM^A- und COM^D-Domänen – mit den genannten Partner-NRPS interagieren. Die Analyse der Kristallstruktur ergab, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von VibH eine α -helikale Struktur ausbilden.



Keating et al., (2002) Nat.Struc.Biol

Abb. 6.3: Kristallstruktur der alleinstehenden C-Domäne VibH des Vibriobactin-Biosynthesesystems

Vergleichbare Strukturdaten für die in dieser Arbeit charakterisierten COM-Domänen von TycA und TycB1 liegen leider nicht vor. Dennoch belegen Sekundärstruktur-Vorhersagen, dass auch diese beiden COM-Domänen vermutlich eine überwiegend α -helikale Struktur besitzen (Abb. 6.4).

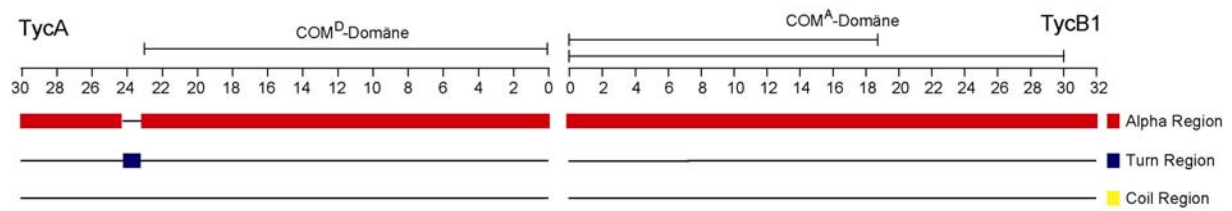


Abb. 6.4: Sekundärstrukturvorhersage der COM-Domänen von TycA und TycB1. Die mit Hilfe des Computerprogramms *Protean* durchgeführte Auswertung der Aminosäuresequenz ergab deutliche Indizien für die Ausbildung α -helikaler Sekundärstrukturen sowohl für die Donor- als auch die Akzeptor-COM-Domäne.

Die Hinweise aus Sekundärstrukturvorhersagen und VibH-Struktur wurden nachfolgend verifiziert. Zu diesem Zweck wurden kurze, synthetische Peptide, die in ihrer Primärstruktur kompatiblen COM-Domänen entsprechen, generiert und mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) analysiert. Untersucht wurden das Peptid C-23 (Analogon der C-terminalen COM^D-Domäne von TycA) mit der Aminosäure-Sequenz AcNH-FSVKGLQMEEMDDIFELLANTLR-CONH₂, sowie die beiden Peptide N-19 und N-30 (Analoge der N-terminalen COM^A-Domäne von TycB1) mit den Aminosäure-Sequenzen AcNH-MSVFSKEQVQDMYALTPMQ-CONH₂ bzw. AcNH-MSVFSKEQVQDMYALTPMQEGMLFHALLDQ-CONH₂. Für alle drei Peptide konnten jeweils charakteristische Compton-Übergänge bei den Wellenlängen $\lambda = 192$ nm, $\lambda = 207$ nm und $\lambda = 222$ nm determiniert werden. Aufgrund der in Abb. 6.5 gezeigten Kurvenverläufe kann daher davon ausgegangen werden, dass die synthetischen Peptide – und vermutlich auch die entsprechenden COM-Domänen von TycA und TycB1, eine α -helikale Struktur ausbilden.

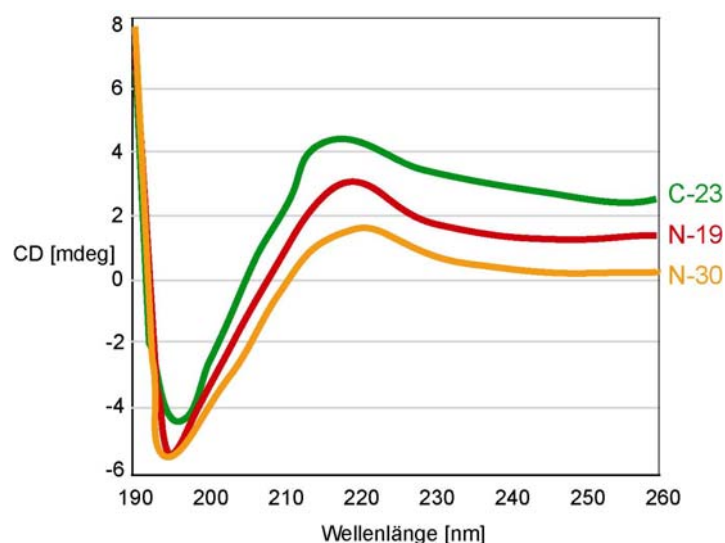


Abb. 6.5: CD-spektroskopische Analyse synthetischer COM^D- und COM^A-Domänen-Analoga. Drei Peptide, C-23, N-19 und N-30, wurden CD-spektrometrisch untersucht, um deren vorhergesagten α -helikalen Charakter zu verifizieren. Alle drei Peptide zeigen den charakteristischen Verlauf eines überwiegend α -helikalen Peptids.

6.3 Bedeutung einzelner Aminosäurereste für die Interaktion zweier COM-Domänen

Aus den vorangegangenen Untersuchungen konnte Hinweise abgeleitet werden, dass COM-Domänen (i) eine α -helikale Strukturen ausbilden und (ii) über polare oder geladene Aminosäure-Reste in transiente Wechselwirkung miteinander treten. Darüber hinaus war aus den Untersuchungen über den Crosstalk zwischen NRP-Biosynthese-Systemen bekannt, dass keineswegs alle Aminosäure-Reste innerhalb einer COM-Domäne zur produktiven (kognaten oder mis-kognaten) Interaktion mit dem Partner-NRPS beitragen. Mit diesem Wissen sollte daher versucht werden, ein Modell für die Interaktion von COM-Domänen und die Vorhersage von Aminosäure-Resten, welche für die Protein-Protein-Wechselwirkung essentiell sind, zu entwickeln.

Annahme 1: Da für die intermolekulare Kommunikation in nichtribosomalen Peptidsynthetasen eine Interaktion zwischen den COM-Domänen der beteiligten Synthetasen erforderlich ist, müssen nach räumlicher Annäherung Wechselwirkungen zwischen den beiden α -helikalen Termini aufgebaut werden. Hierbei können sich die beiden Helices entweder parallel oder antiparallel zueinander anordnen, wobei die antiparallele Orientierung dem in der Natur häufig auftretenden Bindemotiv des Leucin-Zippers ähnelt (Abb. 6.6) [Vinson et al., 2002].

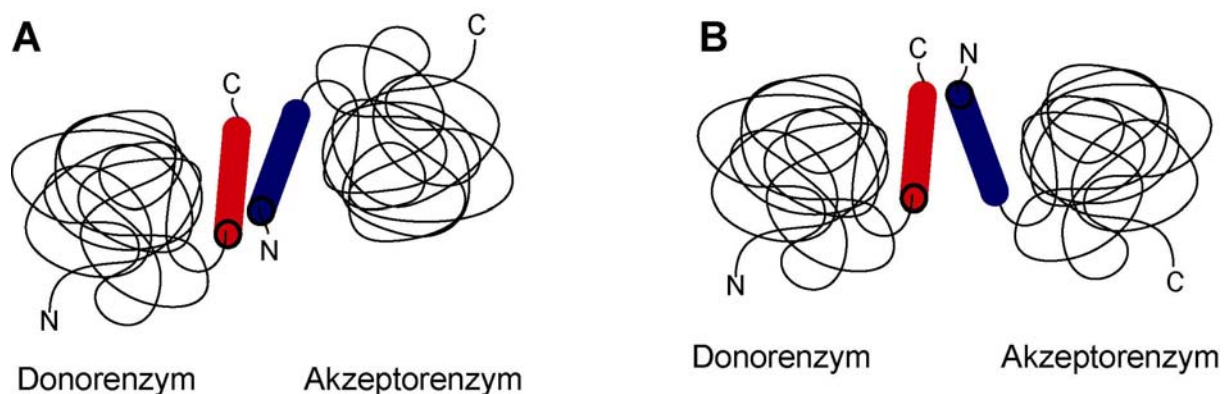


Abb. 6.6: Strukturmodell zur Interaktion von COM-Domänen. Die Kommunikation zwischen Donor- und Akzeptorenzym erfolgt durch Interaktion von Kontaktflächen der α -helikalen COM-Domänen (rot und blau dargestellt). Dabei besteht die Möglichkeit einer parallelen (**A**) und einer antiparallelen, Leucin-Zipper ähnlichen Orientierung der Helices (**B**).

Annahme 2: In einer α -Helix ist jeder Aminosäuresäure-Rest gegenüber dem nächsten um 0,15 nm entlang der Helix-Achse versetzt und um 100° verdreht. Dies

bedeutet, dass Aminosäure-Reste, die in der Primärstruktur um 3 oder 4 Positionen voneinander entfernt sind, innerhalb einer α -Helix in mittelbarer räumlicher Nachbarschaft liegen. Reste, die dagegen nur zwei Positionen auseinander liegen, sind dagegen auf entgegengesetzten Seiten der Helix lokalisiert. Für die Kontaktfläche zwischen zwei α -helikalen COM-Domänen können natürlich nur solche Reste relevant sein, die jeweils auf der gleichen Seite ihrer Helix bzw. COM-Domäne liegen.

Basierend auf beiden Annahmen sollte daher versucht werden, in Helikalen-Netz-Darstellungen der beiden COM-Domänen von TycA und TycB1 nach möglichen Kontaktflächen für transiente Wechselwirkungen zu suchen (Abb. 6.7). In der Tat konnte für eine antiparallele Anordnung der beiden COM-Domänen eine gemeinsame Kontaktfläche determiniert werden, die aus jeweils fünf Aminosäurepaaren aufgebaut wird. Interessanterweise sind an der Ausbildung der putativen Kontaktfläche auf Seiten beider COM-Domänen lediglich polare und geladene Aminosäure-Reste beteiligt. Für das COM-Domänenpaar (A)/(B1) werden hierbei folgende Interaktionen postuliert: K1069/D11 (Pos.1); Q1072/Q8 (Pos. 2), E1074/K6 (Pos. 3), E1075/S5 (Pos. 4) und D1078/S2 (Pos. 5).

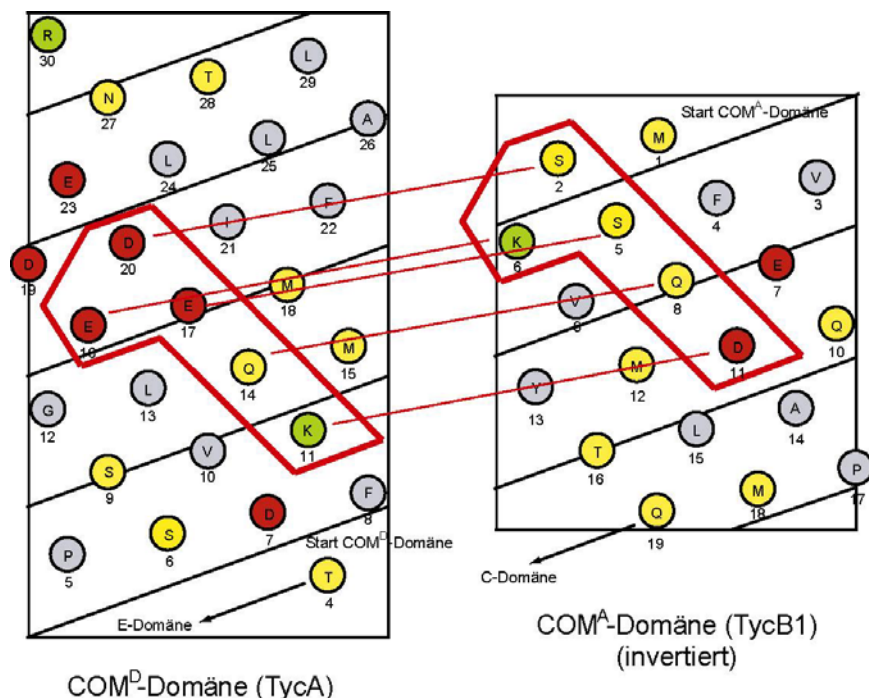


Abb. 6.7: Helical-net Darstellung von Aminosäurewechselwirkungen in Partner-COM-Domänen. Gezeigt sind die COM-Domänen von TycA und TycB1. Durch „antiparallele“ Anordnung der COM-Domänen ergeben sich fünf Aminosäurepaare (rot umrandet), die durch Ausbildung von Wasserstoff- oder Salzbrücken oder durch Hydrophobe Wechselwirkungen zur selektiven Erkennung und Interaktion von COM-Domänen beitragen. Polare Aminosäuren sind gelb, hydrophobe grau, basische grün und saure rot unterlegt.

Bei der Übertragung des aufgestellten Modells auf das COM-Domänenpaar (B3)/C1) ergeben sich folgende Interaktionen: E3573/K9 (Pos. 1), S3576/N6 (Pos. 2), E3578/Q4 (Pos. 3), E3579/K3 (Pos. 4) und N3582/--- (Pos.5). Wie im Falle des COM-Domänenpaares (A)/(B1) finden sich auch für (B3)/(C1) ausschließlich Aminosäure-Paare, die über polare oder ionische Wechselwirkungen stabilisiert werden. Interessanterweise scheint die COM^A-Domäne von TycC1 jedoch zu kurz zu sein, um einen adequaten Partner für den Rest TycB3-N3582 an Position 5 bereitzustellen. Dieses Fehlen könnte durch zusätzliche Interaktion des Lysin K3 (Pos. 4) der COM(C1)-Domäne mit dem Asparagin kompensiert werden. Trotz dieses Unterschiedes scheint das aufgestellte Modell eine plausible Erklärung für die selektive Interaktion zwischen Partner-COM-Domänen zu liefern. Dies wird insbesondere deutlich, wenn auch Aminosäurepaare der COM-Domänen aus dem Gramicidin S- und Surfcatin-Biosynthese-System mit berücksichtigt werden (Abb. 6.8).

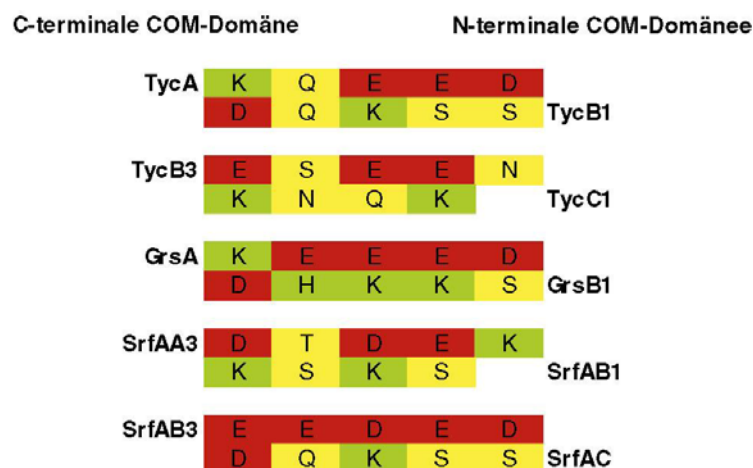


Abb. 6.8: Darstellung interagierender Aminosäuren in COM-Domänenpaaren. Gezeigt sind putativ interagierende Aminosäuren in COM-Domänenpaaren, die den Übergang zwischen E- und C-Domäne vermitteln. Innerhalb desselben Biosynthesesystems sind es vor allem die äußeren Aminosäurereste der COM^D-Domänen bzw. COM^A-Domänen die größere Unterschiede zueinander aufweisen. Diese spielen vermutlich bei der Erkennung des richtigen Partners eine wichtige Rolle. Sie dienen als Ansatzpunkt für Mutationsstudien in COM-Domänen. Polare Aminosäuren sind gelb, hydrophobe grau, basische grün und saure rot unterlegt.

Um die Validität des aufgestellten Modells zu überprüfen, sollte nachfolgend untersucht werden, ob sich die Ergebnisse der durchgeführten Crosstalk-Experimente zwischen dem Tyrocidin- und Surfactin bzw. Gramicidin S- und Surfactin-Biosynthese-System hiermit erklären lassen. Zur Erinnerung: in den genannten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die COM^D-Domänen von

TycA und GrsA aufgrund ihrer hohen Homologie mit den ebenfalls homologen COM^A-Domänen von TycB1 und SrfAC interagieren können. Entsprechend des aufgestellten Modells sollten insbesondere beim Vergleich der fünf interagierenden Aminosäure-Reste signifikante Ähnlichkeiten determinierbar sein. Ein Vergleich dieser Aminosäurereste zwischen den Donorenzymen GrsA und TycA bzw. den Akzeptorenzymen TycB1 und SrfAC ergab in der Tat große Übereinstimmungen. Während in der COM-Domäne von TycA die Reste K1069 (Pos. 1), Q1072 (Pos. 2), E1074 (Pos. 3), E1075 (Pos. 4) und D1078 (Pos. 5) an der Interaktion mit der Partner-COM-Domäne beteiligt zu sein scheinen, sind es im Falle von GrsA die Reste K1079 (Pos. 1), E1082 (Pos. 2), E1084 (Pos. 3), E1085 (Pos. 4) und D1088 (Pos. 5). Auffallend ist die hohe Identität der beteiligten Reste. Nur an Position 2 ist ein Austausch der polaren Aminosäure Glutamin Q1072 durch die saure Aminosäure Glutamat E1082 zu beobachten. Im Falle des Vergleichs von TycB1 und SrfAC sind sogar alle 5 Aminosäurereste identisch (Abb. 6.9).



Abb. 6.9: Vergleich der 5 Aminosäurereste (5-Reste-Modell) zwischen TycA und GrsA (A) bzw. TycB1 und SrfAC (B). Polare Aminosäuren sind gelb, basische grün und saure rot unterlegt.

Aus diesen Übereinstimmungen kann nicht nur geschlossen werden, dass diese Reste für die Kommunikation zwischen COM-Domänen von Synthetasen aus unterschiedlichen Biosynthesystemen verantwortlich sind, sie bieten darüber hinaus auch einen Ansatzpunkt für die Identifizierung kompatibler COM-Domänenpaare und damit neuer Interaktionspartner.

Mit Hilfe des „5-Reste-Modells“ lassen sich zwar die Ergebnisse der bisher durchgeführten Experimente und Beobachtungen zum Crosstalk zwischen Synthetasen aus verschiedenen Biosynthesystemen erklären. Eine andere Frage ist, ob dieses Modell auch in der Lage ist, eine Erklärung für die selektive Ablehnung von Interaktionspartnern zu liefern. Dies sollte exemplarisch am Beispiel des natürlich nicht kommunizierenden Systems TycA/TycC1 untersucht werden (Abb. 6.10).

Eine antiparallele Anordnung der am Aufbau der Kontaktfläche beteiligten Aminosäurepaare würde im Falle des Systems TycA/TycC1 folgende Kombination ergeben: K1069/K9 (Pos.1); Q1072/N6 (Pos. 2), E1074/Q4 (Pos. 3), E1075/K3 (Pos. 4) und D1078/- (Pos. 5)



Abb. 6.10: Interaktion der 5 Aminosäurereste (5-Reste-Modell) der COM-Domänen von TycA und TycC1 im Vergleich zu TycA und TycB1. Polare Aminosäuren sind gelb, basische grün und saure rot unterlegt.

Auffallend ist die Paarung der beiden basischen Aminosäuren K1069/K9 an Position 1. Diese sollten sich aufgrund gleicher Ladungen abstoßen und somit die Wechselwirkungen zwischen den Kontaktflächen der COM-Domänen schwächen. Dagegen sind die Austausche an den Positionen 2-4 im Vergleich zum System TycA/TycB1 durch die Gegenwart verwandter Aminosäuren weitaus konservativer und sollten somit nicht maßgeblich für eine Ablehnung der Nichtpartner-NRPS TycC1 sein. Aus diesen Überlegungen könnte im genannten System die Position 1 eine wichtige Rolle für die Interaktion zwischen TycA und TycB1 bzw. die Nicht-Interaktion zwischen TycA und TycC1 spielen. Möglicherweise hat auch das Fehlen eines Partners an Position 5 einen Einfluss darauf, dass es zu keiner positiven Interaktion zwischen den COM-Domänen von TycA und TycC1 kommt.

Der Nachweis, dass Position 1 für die Nicht-Interaktion zwischen TycA und TycC1 entscheidend ist, konnte durch die Generierung und Analyse der Mutante (C1)TycB1 K9D bereits indirekt erbracht werden. Durch den Austausch der basischen Aminosäure Lysin (K9) durch in der COM-Domäne von TycB1 an Position 1 lokalisierten sauren Aminosäure Aspartat (D11) wurde das natürlich interagierende Aminosäurepaar K1069/D rekonstituiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutation einer Aminosäure (K9D) in der COM-Domäne des Akzeptorenzyms (C1)TycB1 bereits ausreichend ist, die Produktivität des vormals aktiven Systems TycA(B3)/(C1)TycB1 deutlich herabzusetzen und gleichzeitig das zuvor inaktive System TycA/(C1)TycB1 zur Produktbildung zu befähigen. Somit scheint in diesem Fall der Austausch einer basischen Aminosäure (Lysin) durch eine saure Aminosäure (Aspartat) sehr spezifisch die Wechselwirkungen und damit die Interaktion der Synthetasen zwischen den COM-Domänen zu beeinflussen.

Dieser Sachverhalt steht im Einklang mit anderen bekannten Studien zur Wechselwirkung an der Interaktion zwischen zwei Partnern beteiligter Aminosäurereste. So wird in der Literatur allgemein diskutiert, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwar den energetischen Hauptbeitrag zur Interaktion liefern, Wasserstoffbrücken und Salzbindungen dagegen die Spezifität bedingen [Janin, 2000].

Aufbauend auf den Ergebnissen im Zusammenhang mit der Mutante (C1)TycB1 K9D müssen für die Überprüfung des „5-Reste-Modells“ weitere Mutationsstudien unternommen werden. Als Modellsystem könnte dabei wieder das System TycA/TycB1 fungieren. Durch die erfolgreiche Herstellung der Mutante (C1)TycB1 K9D und deren nachweislichen Einfluss auf die Interaktion ist der erste Ansatzpunkt hierfür bereits gegeben. Denkbar wäre die Herstellung der Mutanten TycA(B3) N3582D und TycA(B3) E3573K, wodurch die COM(B3)-Domäne wieder in Richtung der TycA-COM-Domäne verändert und möglicherweise eine Interaktion mit TycB1 erlaubt würde. Gleichzeitig könnte das System TycA(B3) E3573K/(C1)TycB1 K9D ebenfalls wieder zur Dipeptidbildung befähigt sein, was eine Verfeinerung der Rekonstitution der Interaktion durch COM-Domänenaustausch darstellen und einen direkten Hinweis über die Interaktion dieser beiden Aminosäuren liefern würde. Ebenso wäre der Einfluss der Doppelmutante TycA(B3) N3582DE3573K auf die Interaktion interessant zu untersuchen.

Im Idealfall wäre es durch gezielte Mutation möglich, beliebige COM-Domänen unterschiedlicher Synthetasen so zu variieren, dass sie ein kompatibles Partner-COM-Domänenpaar bilden. Dies wäre eine weitere Möglichkeit Synthetasen aus unterschiedlichen Biosynthesystemen *in trans* zu funktionellen Systemen zu kombinieren.

6.4 COM-Domänen-vermittelte biokombinatorische Peptidsynthese

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass kompatible COM-Domänenpaare dazu ausgenutzt werden können, um eine produktive Interaktion zwischen Nichtpartner-NRPS oder NRPS aus verschiedenen NRP-Biosynthese-Systemen zu etablieren. Durch beide Untersuchungen wurde sowohl die Portabilität, als auch das biokombinatorische Potential von NRPS COM-Domänen unter Beweis gestellt. Für die Ausschöpfung dieses Potential sollten nachfolgend erste Schritte unternommen werden.

Die möglichen Ansätze zur praktischen Anwendung von COM-Domänen sind natürlich vielfältig. So könnte beispielsweise versucht werden, die Handhabbarkeit und heterologe Produktion großer multimodularer NRPSs zu erleichtern. Als Beispiel hierfür kann die Cyclosporin A Synthetase (CsaA) mit einer Größe von 1,6 MDa dienen [Weber et al., 1994]. Um eine heterologe Produktion zu ermöglichen, könnte dieses, aus elf Modulen aufgebaute Mega-NRPS durch COM-Domänenfusion intern in kleinere multimodulare NRPS (z.B. hexa- und penta-modular, oder tetra-, tetra- und trimodular) zerlegt werden. Nach heterologer Produktion könnte unter Ausnutzung der kompatiblen COM-Domänen eine selektive Interaktion der Enzyme erhaltenen und so die gerichtete Biosynthese von Cyclosporin A rekonstituiert werden.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel wäre der Crosstalk zwischen NRP-Biosynthese-Systemen. Durch den gezielten Einsatz kompatibler COM-Domänenpaare könnten die NRPSs unterschiedlicher Biosynthese-Systeme zu einem gemeinsamen Biosynthese-Komplex vereinigt werden. Dieser artifizielle NRPS-Komplex würde die Biosynthese völlig neuartiger Peptid-Wirkstoffe katalysieren, welche die Pharmakophore verschiedener Naturstoffe zusammenbringt.

Neben diesen eher rationalen Ansätzen besitzen die COM-Domänen – wie bereits gesagt – ein enormes biokombinatorisches Potential, das durch die Etablierung eines universellen Kommunikationssystems (UKS) ausgenutzt werden sollte. Kernpunkt dieses UKS stellte die Verwendung nur eines einzigen kompatiblen COM-Domänenpaares dar. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass alle NRPS gleichermaßen miteinander interagieren können und es auf diese Weise zur Ausbildung zufälliger NRP-Biosynthese-Komplex kommt. Das Grundprinzip des UKS ist in Abb. 6.11 veranschaulicht.

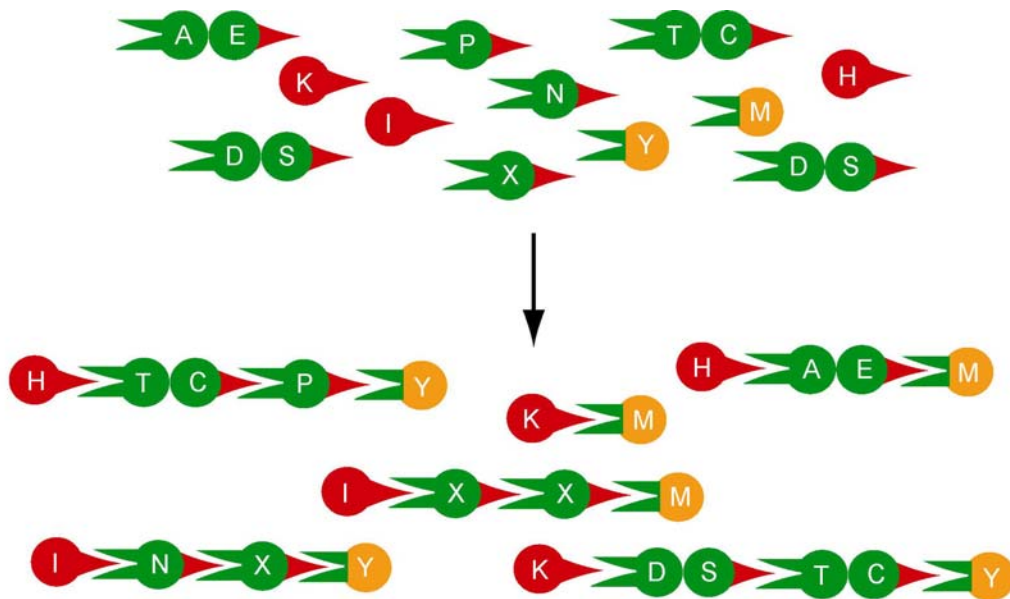


Abb. 6.11: Kombinatorisches Potential des Universellen Kommunikationssystems (UKS). Das UKS besteht aus einem Pool von Initiationsmodulen (rot), Elongationsmodulen (grün) und Terminationsmodulen (orange), die über kompatible Partner-COM-Domänenpaare und dadurch beliebig kombiniert werden können. Durch Kombination der Module entstehen Peptide mit unterschiedlicher Länge und Aminosäurefolge.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines biokombinatorischen Ansatzes zur Generierung neuer Biosynthesysteme müssen die Anforderungen der gerichteten Peptidbiosynthese berücksichtigt werden. Hierfür werden Initiations-, Elongations- und Terminationsmodule benötigt, die in der Lage sind, miteinander *in trans* zu interagieren. In den vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass das Initiationsmodul TycA aufgrund der Kompatibilität der COM-Domänen in der Lage ist sowohl mit Elongationsmodule TycB1 (kognat), als auch mit dem Terminationsmodul SrfAC (mis-kognat) produktive Biosynthese-Komplexe zu bilden. Das fehlende Verbindungsglied auf dem Weg zum UKS (Abb. 6.11) waren beliebige Elongationsmodule die aufgrund der N-terminalen Fusion der COM^A-Domäne von TycB1 und der C-terminalen Fusion der COM^D-Domäne von TycA in der Lage sind, sowohl mit dem Initiationsmodul TycA, als auch dem Terminationsmodul SrfAC zu interagieren. Aufgrund ihrer kompatiblen COM^A- und COM^D-Domänen sollten solche Elongationsmodule darüber hinaus in der Lage sein, mit sich selbst und untereinander in Wechselwirkung zu treten. Konsequenz wäre folglich die Bildung zufälliger NRP-Biosynthese-Komplex und eine „echte“ biokombinatorische Peptidsynthese.

Zur Generierung der benötigten, miteinander universell kommunizierenden Elongationsmodule wurde ein Vektorsystem konstruiert, welches auf den

Möglichkeiten der nachgewiesene Kompatibilität und Portabilität von COM-Domänen basiert (vgl. Kap. 5.6.1). Der konstruierte Vektor pUKS03 trägt die kodierenden Bereiche des kompatiblen COM-Domänenpaares $\text{COM}^{\text{A}}(\text{TycB1})$ und $\text{COM}^{\text{D}}(\text{TycA})$ getrennt durch eine multiple Klonierungsstelle für die Insertion beliebiger Modulkodierender DNA-Fragmente. Hierbei können natürlich gleichermaßen Genfragmente mono-, di- oder multi-modularer NRPSs verwendet werden. Bei der Expression der konstruierten Fusionsgene werden Hybridsynthetasen produziert, die eine N-terminale Fusion mit $\text{COM}^{\text{A}}(\text{TycB1})$, sowie eine C-terminale Fusion mit $\text{COM}^{\text{D}}(\text{TycA})$ tragen. Darüber verfügen die rekombinanten Proteine über einen C-terminalen Hexahistidin-Tag, um eine einfache und zügige Reinigung der Hybrid-NRPSs zu gewährleisten.

Als „proof-of-concept“ wurde das Genfragment des Ornithin-aktivierenden BacB2 (zweites Modul der Bacitracin-Synthetase B; Domänenorganisation: C- A_{Orn} -PCP-E) in den konstruierten Vektor pUKS03 kloniert. Nachfolgend konnte die gereinigte Hybridsynthetase (B1)BacB2(A) im UKS mit dem Initiationsmodul $\text{TycA}(\text{A})\Delta\text{E}$ und dem Terminationsmodul SrfAC umgesetzt werden. Neben der Bildung des Dipeptids Phe-Leu, welches durch die direkte Interaktion von Initiations- und Terminationsmodul gebildet wurde, konnte darüber hinaus die erhoffte/erwartete Synthese des Tripeptids Phe-Orn-Leu nachgewiesen werden. Dieses Beispiel deutet das Potential des UKS für eine biokombinatorische Synthese an. Nachfolgend sollen weitere Elongationsenzyme generiert und im UKS getestet werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit das Verhältnis und die Sequenz der gebildeten Peptide durch Variation der eingesetzten Enzym-Konzentrationen beeinflusst werden kann. Beispielsweise wäre zu erwarten, dass eine Reduktion der Konzentration des Initiationsmoduls $\text{TycA}(\text{A})\Delta\text{E}$ und/oder eine Erhöhung der Konzentration des Elongationsmoduls (B1)BacB2(A) die Bildung des Tripeptids positiv fördern würde. Unter geeigneten Bedingungen sollte selbst die Synthese von Tetra- und Pentapeptiden der allgemeinen Sequenz $\text{Phe}-(\text{Orn})_x\text{-Leu}$ möglich sein.

Die präsentierten Ergebnisse zum UKS zeigen, dass NRPSs aus verschiedenen NRP-Biosynthese-Systemen unter Verwendung kompatibler Partner-COM-Domänenpaare zu einer intermolekularen Interaktion und Produktbildung befähigt sind. Die bislang gezeigten und untersuchten Eigenschaften machen sie zu einem wichtigen und leistungsstarken Werkzeug bei der Generierung hybrider Synthetasen und der Synthese neuartiger Naturstoffe.

6.5 Vergleich zwischen NRPS-COM- und PKS-Docking-Domänen

Eine den COM-Domänen ähnliche Funktion bei der Etablierung von Protein-Protein-Interaktionen konnte kürzlich für sogenannte Docking- (oder Linker-) Domänen in Polyketidsynthasen (PKSs) nachgewiesen werden. PKSs bilden die biosynthetische Matrize für die Produktion pharmakologisch-relevanter Polyketidantibiotika [Hopwood, 1997] und sind wie die NRPSs modular aufgebaut. Auch hinsichtlich ihrer Domänenorganisation und den durch die Domänen vermittelten Reaktionen lassen sich viele Gemeinsamkeiten erkennen. So sind beispielsweise PKS-Docking- und NRPS-COM-Domänen gleichermaßen für die selektive intermolekulare Kommunikation zwischen Partner-Enzymen verantwortlich und erfüllen diese Aufgabe durch die Bildung kompatibler Docking- oder COM-Domänen-Paare.

Weitere Gemeinsamkeiten finden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und (mit Abstrichen) ihrer Struktur. So sind sowohl Docking- als auch COM-Domänen an den jeweiligen C- und N-Termini der Partner-Enzyme lokalisiert. Auf der Basis von NMR-Strukturdaten konnte gezeigt werden, dass ein kompatibles PKS-Docking-Domänenpaar ein dimeres 4-Helix-Bündel bildet (ca. 120 aa), welches durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird [Broadhurst et al., 2003]. Drei Helices können hierbei der Donor-seitigen Docking-Domäne zugeordnet werden, die mit ca. 90 Aminosäure-Resten ca. dreimal so groß ist wie die Akzeptor-seitige Partner-Docking-Domäne (ca. 30 aa), welche die vierte Helix bereitstellt.

Die Struktur eines kompatiblen COM-Domänenpaares konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden. Aufgrund von Sekundärstruktur-Vorhersagen, der Ergebnisse von CD-spektrometrischen Untersuchungen synthetischer Peptide und unter Berücksichtigung der Kristallstruktur der alleinstehenden NRPS-C-Domäne VibH [Keating et al., 2002] kann aber davon ausgegangen werden, dass auch COM-Domänen eine α -helikale Struktur besitzen und als kompatibles COM-Domänenpaare eine Leucin-Zipper-ähnliche Struktur ausbilden. Ein kompatibles COM-Domänenpaar ist weitaus kleiner als sein PKS-Pendant und besteht lediglich aus 35–55 Aminosäuren, wobei sich die Größe von COM^D- (20-30 AS) und COM^A-Domänen (15-25 AS) kaum unterscheidet.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen PKS-Docking- und NRPS-COM-Domänen besteht hinsichtlich ihres Beitrages zur selektiven intermolekularen

Kommunikation. Untersuchungen in PKS-Systemen zeigten, dass neben der Präsenz einer kompatiblen Partner-Docking-Domäne auch das Donorsubstrat einen Einfluss auf die Effizienz der Protein-Protein-Kommunikation hat [Wu et al., 2001]. Dagegen konnte im Falle der COM-Domänen kein Einfluss des Donorsubstrates beobachtet werden. So war das artifizielle System TycA/SrfAC durchaus in der Lage, das Dipeptid DPhe-LLeu zu produzieren. Statt DPhe akzeptiert und prozessiert die Synthetase SrfAC im natürlichen Biosynthesesystem Surfactin die Donoraminosäure DLeu.

Neben reinen PKS- und NRPS-Biosynthese-Systemen werden in der Natur auch häufig Hybrid-Systeme gefunden. Als Beispiele können die Biosynthesekomplexe der Antitumor-Wirkstoffe Epothilon und Bleomycin, sowie des Siderophors Yersiniabactin angeführt werden. In diesen gemischten NRPS/PKS-Systemen kommt es zur intermolekularen Kommunikation zwischen NRPS- und PKS-Modulen und damit zur Interaktion zwischen NRPS-COM-Domänen und PKS-Docking-Domänen. Erste Untersuchungen zur intermolekularen Kommunikation in solchen Hybridsystemen wurden jüngst am Epothilon-Biosynthesesystem durchgeführt [Lui et al., 2004]. Innerhalb der Epothilon-Biosynthese-Matrize interagiert die 165 kDa-große NRPS EpoB mit dem Acyl-Donor EpoA (PKS) und dem Akzeptor-PKS EpoC. Interessanterweise fanden die Autoren, dass die 56 N-terminalen Aminosäure-Reste von EpoB für die produktive Interaktion mit EpoA benötigt werden. Diese Region ist damit größer als konventionelle NRPS-COM^A- oder PKS-Docking-Domänen und enthält aufgrund von Sekundärstruktur-Vorhersagen zwei α -helikale Bereiche. Am C-Terminus von EpoB konnte eine Region von 34 Aminosäure-Resten determiniert werden, die zumindest aufgrund ihrer Größe einer gewöhnlichen NRPS-COM^D-Domäne entspricht. Allerdings konnten keine klaren Hinweise auf das Vorliegen einer α -helikalen Struktur gewonnen werden. Auch konnte gezeigt werden, dass diese Region besonders reich an positiv-geladenen Aminosäure-Resten ist, von denen sechs wichtig für den Kontakt mit dem Akzeptor-PKS EpoC sind. Zur Erinnerung: für die in dieser Arbeit untersuchten COM^D-Domänen konnte gezeigt werden, dass diese überproportional viele negativ-geladene Aminosäure-Reste enthalten. Diese Daten könnten darauf hindeuten, dass die Natur unterschiedliche Strategien entwickelt hat, um eine produktive Interaktion zwischen (i) PKS/PKS, (ii) NRPS/NRPS und (iii) NRPS/PKS-Hybriden zu etablieren.

6.6 Nächste Schritte - ein kurzer Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten auf der Basis von Deletionsstudien und Domänen austauschexperimenten die für die intermolekulare Kommunikation zwischen NRPS verantwortlichen Bereiche identifiziert werden. Eine am C-Terminus des Donorenzyms gelegene COM^D-Domäne und eine am N-Terminus des Akzeptorenzyms gelegene COM^A-Domäne bilden hierbei ein kompatibles COM-Domänenpaar, welches essentiell und hinreichend für die Vermittlung einer spezifischen Protein-Protein-Interaktion ist. Zur Untersuchung der Stabilität dieses heterodimeren Komplexes könnten Bestimmungen der Dissoziationskonstante K_D z.B. durch Mikrokalorimetrie oder BioCore beitragen. Begleitet werden könnten diese Untersuchungen durch Mutationsstudien an COM-Domänen, um den Beitrag einzelner Aminosäure-Reste zu determinieren.

Auf struktureller Ebene zeigte die Analyse von COM-Domänen (*in silico* und CD-Spektroskopie an synthetischen Peptiden), dass diese vermutlich eine α -helicale Struktur besitzen und ihre transiente Interaktion über polare und geladene Aminosäure-Reste vermittelt wird. In Analogie zu den von Broadhurst et al. durchgeführten Studien könnten NMR- und/oder Röntgenstruktur-Untersuchungen dazu beitragen, dieses Modell zu überprüfen. Auf der Basis von *in silico*-Analysen konnte darüber hinaus die Arbeitshypothese aufgestellt werden, wonach fünf Aminosäure-Paare zwischen COM^D- und COM^A-Domänen über Interaktion oder Nichtinteraktion zwischen zwei NRPS entscheiden. Die Validität des aufgestellten Modells sollte durch weitere Mutationsanalysen untermauert werden.

Aufgrund ihrer nachgewiesenen Portabilität besitzen COM-Domänen ein enormes biokombinatorisches Potential und eröffnen bisher nicht vorhandene Möglichkeiten zum rationalen Design artifizierlicher NRP-Biosynthese-Komplexe. Erste Schritte in diese Richtung konnten durch die Etablierung des universellen Kommunikationssystems (UKS) bereits unternommen werden. Das bereits vorhandene System TycA(A) Δ E-(B1)BacB2(A)-SrfAC könnte weiteren Untersuchungen unterzogen werden, um insbesondere den Einfluss des molaren Verhältnisses der beteiligten Elongations- und Terminationsmodule auf das Muster der synthetisierten Produkte zu ermitteln. Durch die Generierung und Untersuchung weiterer Initiations-, Elongations- und Terminationsenzyme könnten weitere Erfahrungen gesammelt werden, um das UKS gemäß seiner eigentlichen

Bestimmung für eine echte biokombinatorische Synthese von Peptiden und ggf. Generierung neuartiger Naturstoffe einzusetzen.

7 LITERATUR

- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K. & Campos-Takaki, G.M. (1993) Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, **42**, 1-7.
- Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**, 179-186.
- Belshaw, P.J., Roy, R.S., Kelleher, N.L. & Walsh, C.T. (1998) Kinetics and regioselectivity of peptide-to-heterocycle conversions by microcin B17 synthetase. *Chem Biol*, **5**, 373-384.
- Belshaw, P.J., Walsh, C.T. & Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science*, **284**, 486-489.
- Bennett, J. & Scott, K.J. (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem*, **43**, 173-182.
- Bergendahl, V., Linne, U. & Marahiel, M.A. (2002) Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem*, **269**, 620-629.
- Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B. & Muller, R. (1999) Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim Biophys Acta*, **1445**, 185-195.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Broadhurst, R.W., Nietlispach, D., Wheatcroft, M.P., Leadlay, P.F. & Weissman K.J. (2003) The structure of docking domains in modular polyketide synthases. *Chem Biol*, **10**, 723-731.
- Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. & Stubbs, M.T. (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (Camb)*, **10**, 301-310.
- Brunner, R. (1965) Polypeptide. In *Antibiotika*. Verlag Carl, Nürnberg, Deutschland.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T. & Dobberstein, B. (1987) A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **155**, 416-433.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta- galactosidase selection. *Biotechniques*, **5**, 376-379.
- Bush, K. & Mobashery, S. (1998) How beta-lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. From mechanistic knowledge to clinical circumvention. *Adv Exp Med Biol*, **456**, 71-98.
- Byford, M.F., Baldwin, J.E., Shiau, C.Y. & Schofield C.J. (1997) The Mechanism of ACV Synthetase. *Chem Rev*, **10**, 2631-2650.

- Cane, D.E. & Walsh, C.T.** (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **6**, R319-325.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. & Khosla, C.** (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*, **282**, 63-68.
- Capili, A.D., Schultz, D.C., RauscherIII, F.J. & Borden, K.L.** (2001) Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBO J*, **20**, 165-177.
- Casqueiro, J., Gutierrez, S., Banuelos, O., Fierro, F., Velasco, J. & Martin, J.F.** (1998) Characterization of the lys2 gene of *Penicillium chrysogenum* encoding alpha-aminoadipic acid reductase. *Mol Gen Genet*, **259**, 549-556.
- Chambers, H.F.** (1987) Coagulase-negative staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**, 1919-1924.
- Ciechanover A.** (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J*, **17**, 7151-7160.
- Conti, E., Franks, N.P. & Brick, P.** (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, **4**, 287-298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. & Brick, P.** (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non- ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J*, **16**, 4174-4183.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B. & Kosaric, N.** (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 408-412.
- Copley, R.R., Doerks, T., Letunic, I. & Bork, P.** (2002) Protein domain analysis in the era of complete genomes. *FEBS Lett*, **513**(1), 129-134.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. & van Sinderen, D.** (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **8**, 821-831.
- Crosa, J.H. & Walsh, C.T.** (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 223-249.
- Crump, M.P., Crosby, J., Dempsey, C.E., Parkinson, J.A., Murray, M., Hopwood, D.A. & Simpson, T.J.** (1997) Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry*, **36**, 6000-6008.
- de Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C. & Grandi, G.** (1997) Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptides. *J Biol Chem*, **272**, 25304-25309.
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett*, **357**, 212-216.
- Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M., von Dohren, H. & Kleinkauf, H.** (1999) Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1. *J Mol Biol*, **288**, 129-140.

- Diez, B., Gutierrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H. & Martin, J.F. (1990) The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the pcbAB gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase and linkage to the pcbC and penDE genes. *J Biol Chem*, **265**, 16358-16365.
- Doekel, S. (2000) Synthese von Dipeptiden an hybriden Peptidsynthetasen. *Dissertation, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität, Marburg (Lahn)*.
- Doekel, S. & Marahiel, M.A. (2000) Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem Biol*, **7**, 373-384.
- Donaldson, L.W., Gish, G., Pawson, T., Kay, L.E. & Forman-Kay, J.D. (2002) Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14053-14058.
- Du, L., Chen, M., Sanchez, C. & Shen, B. (2000) An oxidation domain in the BImIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol Lett*, **189**, 171-175.
- Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Muller, R. & Marahiel, M.A. (2004) Rational design of a bimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chem Biol*, **11**, 261-271.
- Duerfahrt, T., Doekel, S., Sonke, T., Quaedflieg, P.J. & Marahiel, M.A. (2003) Construction of hybrid peptide synthetases for the production of alpha-l-aspartyl-l-phenylalanine, a precursor for the high-intensity sweetener aspartame. *Eur J Biochem*, **270**, 4555-4563.
- Ehmann, D.E., Gehring, A.M. & Walsh, C.T. (1999) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of alpha-aminoadipate reductase (Lys2) involves posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry*, **38**, 6171-6177.
- Ehmann, D.E., Trauger, J.W., Stachelhaus, T. & Walsh, C.T. (2000) Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **7**, 765-772.
- Elsner, A., Engert, H., Saenger, W., Hamoen, L., Venema, G. & Bernhard, F. (1997) Substrate specificity of hybrid modules from peptide synthetases. *J Biol Chem*, **272**, 4814-4819.
- Eppelmann, K., Doekel, S. & Marahiel, M.A. (2001) Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, **11**, 11.
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A. (2002) Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry*, **41**, 9718-9726.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203-206.
- Farabough, P.J. (1978) Sequence of the *lacI* gene. *Nature*, **274**, 765-769.
- Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schafer, A., Jahn, D. & Marahiel, M.A. (2002) Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **277**, 50293-50302.
- Flemming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Path.*, **10**, 226-236.

- Fujikawa, K., Sakamoto, Y. & Kurahashi, K.** (1971). Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of *Bacillus brevis* ATCC 8185. 3. Further purification of components I and II and their functions in tyrocidine synthesis. *J Biochem (Tokyo)* **69**, 869-879.
- Fujikawa, K., Suzuki, T. & Kurahashi, K.** (1968). Biosynthesis of tyrocidine by a cell-free enzyme system of *Bacillus brevis* ATCC 8185. I. Preparation of partially purified enzyme system and its properties. *Biochim Biophys Acta*, **161**, 232-246.
- Gaitatzis, N., Kunze, B. & Muller, R.** (2001) In vitro reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11136-11141.
- Gehring, A.M., DeMoll, E., Fetherston, J.D., Mori, I., Mayhew, G.F., Blattner, F.R., Walsh, C.T. & Perry, R.D.** (1998a) Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem Biol*, **5**, 573-586.
- Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D. & Walsh, C.T.** (1998b) The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*, **37**, 17104-17111.
- Gentz, R. & Bujard, H.** (1985) Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J Bacteriol*, **164**, 70-77.
- Gocht, M. & Marahiel, M.A.** (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol*, **176**, 2654-2662.
- Gokhale, R.S., Tsuji, S.Y., Cane, D.E. & Khosla, C.** (1999) Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science*, **284**, 482-485.
- Grodberg, J. & Dunn, J.J.** (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, **170**, 1245-1253.
- Groves MR, Barford D.** (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 383-389.
- Gruenewald, S., Mootz, H.D., Stehmeier, P. & Stachelhaus, T.** (2004) In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 3282-3291.
- Haavik, H.I. & Froyshov, O.** (1975) Function of peptide antibiotics in producer organisms. *Nature*, **254**, 79-82.
- Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. & Zocher, R.** (1993) Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol Microbiol*, **7**, 905-914.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. & Nakayama, K.I.** (2001) U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem*, **276**, 33111-33120.
- Hill, J.B. & Gelman, Y.** (1990) Process for the preparation of a alpha-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester hydrochloride by use of isolated N-formyl-L-aspartic anhydride. *US-Patent*, US-A-4,946,988.
- Hopwood, D.A.** (1997) Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem Rev*, **97**, 2465-2498.

- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-68.
- Hubbard, B.K. & Walsh, C.T. (2003) Vancomycin Assembly: Nature's Way. *Angew Chem Int Ed*, **42**, 730-765.
- Hunter, F. E. J. & Schwartz, L. S. (1967) Tyrocidines and Gramicidin S (J1, J2). In *Antibiotics I (Mode of action)*, 142-152. Editoren D. Gottlieb & P. D. Shaw. Springer-Verlag, New York.
- Hutchinson, C.R. (2003) Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: Falling together by coming apart. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Ikai, Y., Oka, H., Hayakawa, J., Harada, K.I. & Suzuki, M. (1992) Structural characterization of bacitracin components by Frit-fast atom bombardment (FAB) liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). *J Antibiot (Tokyo)*, **45**, 1325-1334.
- Ishihara, H. & Shimura, K. (1979) Thiazoline ring formation in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett*, **99**, 109-112.
- Ishihara, H. & Shimura, K. (1988) Further evidence for the presence of a thiazoline ring in the isoleucylcysteine dipeptide intermediate in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett*, **226**, 319-323.
- Janin, J. (2000) Kinetics and thermodynamics of protein-protein interactions from a structural perspective. 1-31, in Kleanthous, C. (ed.) *Protein-Protein Recognition*, Oxford University Press.
- Johnson, B.A., Anker, H. & Meleney, F.L. (1945) Bacitracin: A new antibiotic produced by a member of the B. subtilis group. *Science*, **102**, 376-377.
- Katz, E. & Demain, A. L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev*, **41**, 449-474.
- Keating, T.A., Marshall, C.G. & Walsh, C.T. (2000) Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry*, **39**, 15522-15530.
- Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T. & Keating, A.E. (2002) The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol*, **9**, 522-526.
- Keating, T.A. & Walsh, C.T. (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 598-606.
- Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U. & Marahiel, M.A. (2004) The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem*, **279**(9):7413-7419.
- Kipreos, E.T. & Pagano M. (2000) The F-box protein family. *Genome Biol*, **1**, REVIEWS3002.
- Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. (2001) Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, **40**, 7099-7108.
- Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. & Marahiel, M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem Biol*, **4**, 927-937.
- Konz, D. & Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol*, **6**, R39-48.

- Kuriyan, J. & Cowburn D. (1997) Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26, 259-288.
- Kwon, Y.T., Kashina, A.S., Davydov, I.V., Hu, R.G., An, J.Y., Seo, J.W., Du, F. & Varshavsky, A. (2002) An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science*, 297, 6-9.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol*, 3, 923-936.
- Lee, S.G. & Lipmann, F. (1975) Tyrocidine synthetase system. *Methods Enzymol.*, 43, 585-602.
- Li, J., Szittner, R., Derewenda, ZS. & Meighen, E.A. (1996) Conversion of serine-114 to cysteine-114 and the role of the active site nucleophile in acyl transfer by myristoyl-ACP thioesterase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry*, 35(31), 9967-73.
- Linne, U., Stein, D.B., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A. (2003) Systematic and quantitative analysis of protein-protein recognition between nonribosomal peptide synthetases investigated in the tyrocidine biosynthetic template. *Biochemistry*, 42, 5114-5124.
- Linne, U., Doekel, S. & Marahiel, M.A. (2001) Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 40, 15824-15834.
- Linne, U. & Marahiel, M.A. (2000) Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry*, 39, 10439-10447.
- Liu, F., Garneau, S. & Walsh, C.T. (2004) Hybrid Nonribosomal Peptide-Polyketide Interfaces in Epothilone Biosynthesis; Minimal Requirements at N and C Termini of EpoB for Elongation. *Chem Biol*, 11, 1533-1542.
- Losey, H.C., Peczuh, M.W., Chen, Z., Eggert, U.S., Dong, S.D., Pelczer, I., Kahne, D. & Walsh, C.T. (2001) Tandem action of glycosyltransferases in the maturation of vancomycin and teicoplanin aglycones: novel glycopeptides. *Biochemistry*, 40, 4745-4755.
- Luo, L., Kohli, R.M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T. (2002) Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry*, 41, 9184-9196.
- Makinen, K.K. (1972) Inhibition by bacitracin of some hydrolytic enzymes. *Int J Protein Res*, 4, 21-28.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, H.D. (1997) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem. Rev.*, 97, 2651-2673.
- Marshall, C.G., Burkart, M.D., Keating, T.A. & Walsh, C.T. (2001) Heterocycle formation in vibriobactin biosynthesis: alternative substrate utilization and identification of a condensed intermediate. *Biochemistry*, 40, 10655-10663.
- Marshall, C.G., Hillson, N.J. & Walsh, C.T. (2002) Catalytic mapping of the vibriobactin biosynthetic enzyme VibF. *Biochemistry*, 41, 244-250.
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A. & Stubbs, M.T. (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12120-12125.

- May, J.J., Wendrich, T.M. & Marahiel, M.A. (2001) The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem*, **276**, 7209-7217.
- Miller, D.A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T.A. & Walsh, C.T. (2002) Yersiniabactin Synthetase. A Four-Protein Assembly Line Producing the Nonribosomal Peptide/Polyketide Hybrid Siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol*, **9**, 333-344.
- Miller, D.A. & Walsh, C.T. (2001) Yersiniabactin synthetase: probing the recognition of carrier protein domains by the catalytic heterocyclization domains, Cy1 and Cy2, in the chain-initiating HWMP2 subunit. *Biochemistry*, **40**, 5313-5321.
- Milne, J.C., Eliot, A.C., Kelleher, N.L. & Walsh, C.T. (1998) ATP/GTP hydrolysis is required for oxazole and thiazole biosynthesis in the peptide antibiotic microcin B17. *Biochemistry*, **37**, 13250-13261.
- Mofid, M.R., Finking, R. & Marahiel, M.A. (2002) Recognition of hybrid PCP/ACP acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem*, **26**, in press.
- Mofid, M.R., Marahiel, M.A., Ficner, R. & Reuter, K. (1999) Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1098-1100.
- Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D.D., Gorlach, J., Mayo, J.M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J. & Ligon, J.M. (2000) The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol*, **7**, 97-109.
- Mootz, H.D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A. (2002a) Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *J Am Chem Soc*, **124**, 10980-10981.
- Mootz, H.D. (1999) Charakterisierung des Biosynthese-Operons für das Peptidantibiotikum Tyrocidin und Konstruktion von Hybridpeptidsynthetasen. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg.
- Mootz, H.D. & Marahiel, M.A. (1997) The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol*, **179**, 6843-6850.
- Mootz, H.D. & Marahiel, M.A. (1999) Design and application of multimodular peptide synthetases. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 341-348.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A. (2000) Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5848-5853.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A. (2002b) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, **3**, 490-504.
- Neumüller, A.M., Konz, D. & Marahiel, M.A. (2001) The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem*, **268**, 3180-3189.
- Parris, K.D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C.C., Seehra, J. & Somers, W.S. (2000) Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure Fold Des*, **8**, 883-895.

- Paulsen, I.T., Brown, M.H. & Skurray, R.A.** (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev*, **60**, 575-608.
- Pavela-Vrancic, M., Dieckmann, R., Dohren, H.V. & Kleinkauf, H.** (1999) Editing of non-cognate aminoacyl adenylates by peptide synthetases. *Biochem J*, **342 Pt 3**, 715-719.
- Pazirandeh, M., Chirala, S.S. & Wakil, S.J.** (1991) Site-directed mutagenesis studies on the recombinant thioesterase domain of chicken fatty acid synthase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **266**, 20946-20952.
- Philipp, W.J., Poulet, S., Eiglmeier, K., Pascopella, L., Balasubramanian, V., Heym, B., Bergh, S., Bloom, B.R., Jacobs, W.R., Jr. & Cole, S.T.** (1996) An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3132-3137.
- Pieper, R., Haese, A., Schroder, W. & Zocher, R.** (1995) Arrangement of catalytic sites in the multifunctional enzyme enniatin synthetase. *Eur J Biochem*, **230**, 119-126.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-599.
- Quadri, L.E., Keating, T.A., Patel, H.M. & Walsh, C.T.** (1999) Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry*, **38**, 14941-14954.
- Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H. & Walsh, C.T.** (1998a) Identification of a *mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol*, **5**, 631-645.
- Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. & Walsh, C.T.** (1998b) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, **37**, 1585-1595.
- Rapaport, E., Remy, P., Kleinkauf, H., Vater, J. & Zamecnik, P.C.** (1987) Aminoacyl-tRNA synthetases catalyze AMP----ADP----ATP exchange reactions, indicating labile covalent enzyme-amino-acid intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7891-7895.
- Rawlings, M. & Cronan, J.E., Jr.** (1992) The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes. *J Biol Chem*, **267**, 5751-5754.
- Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D.V., Hutchinson, C.R. & McDaniel, R.** (2003) A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry*, **42**, 72-79.
- Reimann, C., Patel, H.M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C.T. & Haas, D.** (2001) Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **183**, 813-820.
- Reimann, C., Serino, L., Beyeler, M. & Haas, D.** (1998) Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **144 (Pt 11)**, 3135-3148.

- Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A. & Ficner, R. (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme *sfp*: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo J*, **18**, 6823-6831.
- Rieber, M., Imaeda, T. & Cesari, I.M. (1969) Bacitracin action on membranes of mycobacteria. *J Gen Microbiol*, **55**, 155-159.
- Ristow, H., Pschorn, W., Hansen, J. & Winkel, U. (1979). Induction of sporulation in *Bacillus brevis* by peptide antibiotics. *Nature*, **280**, 165-166.
- Ristow, H., Russo, J., Stochaj, E. & Paulus, H. (1982). Tyrocidine induced sporulation of *Bacillus brevis* in a medium lacking a nitrogen source. In *Peptide Antibiotics*, S. 381-388. Editoren H. Kleinkauf & H. von Döhren. W. de Gruyter, Berlin.
- Rodriguez, E. & McDaniel, R. (2001) Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 526-534.
- Roskoski, R., Jr., Gevers, W., Kleinkauf, H. & Lipmann, F. (1970a). Tyrocidine biosynthesis by three complementary fractions from *Bacillus brevis* (ATCC 8185). *Biochemistry* **9**, 4839-4845.
- Roskoski, R., Jr., Kleinkauf, H., Gevers, W. & Lipmann, F. (1970b). Isolation of enzyme-bound peptide intermediates in tyrocidine biosynthesis. *Biochemistry* **9**, 4846-4851.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. & Sivonen, K. (2000) Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol*, **37**, 156-167.
- Roy, R.S., Gehring, A.M., Milne, J.C., Belshaw, P.J. & Walsh, C.T. (1999) Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Nat Prod Rep*, **16**, 249-263.
- Ruttenberg, M. A. & Mach, B. (1966). Studies on amino acid substitution in the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine. *Biochemistry*, **5**, 2864-2869.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schazschneider, B., Ristow, H. & Kleinkauf, H. (1974). Interaction between the antibiotic tyrocidine and DNA *in vitro*. *Nature*, **249**, 757-759.
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. & Keller, U. (2000) Construction and *in vitro* analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem Biol*, **7**, 287-297.
- Schechter, N., Momose, K. & Rudney, H. (1972) The effect of bacitracin and Ca ++ on the formation of polyprenylpyrophosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. *Biochem Biophys Res Commun*, **48**, 833-839.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine A.J. & Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136.
- Schneider, A. & Marahiel, M.A. (1998) Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol*, **169**, 404-410.

- Schneider, A., Stachelhaus, T. & Marahiel, M.A.** (1998) Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. *Mol Gen Genet*, **257**, 308-318.
- Schneider, T.L., Shen, B. & Walsh, C.T.** (2003) Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry*, **42**, 9722-9730.
- Schreiber, S.L.** (1998) Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg Med Chem*, **6**, 1127-1152.
- Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M.A.** (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*, **20**, 275-287.
- Schwarzer, D. & Marahiel, M.A.** (2001) Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, **88**, 93-101.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U. & Marahiel, M.A.** (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14083-14088.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (2001) Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chem Biol*, **8**, 997-1010.
- Scutcliffe, J.G.** (1979) Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Meth. Enzymol.*, **43**, 77-90.
- Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C. & Walsh, C.T.** (1999) Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol*, **6**, 385-400.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D.J., Chen, M. & Murrell, J.M.** (2002) Cloning and characterization of the bleomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *J Nat Prod*, **65**, 422-431.
- Silakowski, B., Kunze, B. & Muller, R.** (2001) Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene*, **275**, 233-240.
- Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blocker, H., Hofle, G. & Muller, R.** (2000) The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur J Biochem*, **267**, 6476-6485.
- Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blocker, H., Hofle, G., Beyer, S. & Muller, R.** (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem*, **274**, 37391-37399.
- Smith, D.J., Earl, A.J. & Turner, G.** (1990) The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *Embo J*, **9**, 2743-2750.
- Srivastava, D.K. & Bernhard, S.A.** (1986) Metabolite transfer via enzyme-enzyme complexes. *Science*, **234**, 1081-1086.
- Stachelhaus, T., Huser, A. & Marahiel, M.A.** (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol*, **3**, 913-921.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. & Marahiel, M.A.** (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem*, **273**, 22773-22781.

- Stachelhaus, T., Mootz, H.D. & Marahiel, M.A.** (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **6**, 493-505.
- Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M.A.** (1995) Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science*, **269**, 69-72.
- Stachelhaus, T. & Walsh, C.T.** (2000) Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, **39**, 5775-5787.
- Staunton, J. & Weissman, K.J.** (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep*, **18**, 380-416.
- Steffensky, M., Muhlenweg, A., Wang, Z.X., Li, S.M. & Heide, L.** (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 1214-1222.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. & Morris, H.R.** (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem*, **271**, 15428-15435.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P. & Vater, J.** (1999) Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem Biol*, **6**, 31-41.
- Stüber, D., Matile, H. and Garotta, G.** (1990) System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In Levkovits, I. and Pernis, B. (eds.), *Immunological Methods*, pp. 121-152.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Symmank, H., Saenger, W. & Bernhard, F.** (1999) Analysis of engineered multifunctional peptide synthetases. Enzymatic characterization of surfactin synthetase domains in hybrid bimodular systems. *J Biol Chem*, **274**, 21581-21588.
- Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C. & Julien, B.** (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science*, **287**, 640-642.
- Tai, M.H., Chirala, S.S. & Wakil, S.J.** (1993) Roles of Ser101, Asp236, and His237 in catalysis of thioesterase II and of the C-terminal region of the enzyme in its interaction with fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(5), 1852-1856.
- Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. & Walsh, C.T.** (2000) Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature*, **407**, 215-218.
- Tsuji, S.Y., Cane, D.E. & Khosla, C.** (2001) Selective protein-protein interactions direct channeling of intermediates between polyketide synthase modules. *Biochemistry*, **40**, 2326-2331.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. & Wrana, J.L.** (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*, **95**, 779-791.

- van Wageningen, A.M., Kirkpatrick, P.N., Williams, D.H., Harris, B.R., Kershaw, J.K., Lennard, N.J., Jones, M., Jones, S.J. & Solenberg, P.J. (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol*, **5**, 155-162.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 615-619.
- von Döhren, H., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R. (1997) Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem Rev*, **97**, 2675-2706.
- Walsh, C.T. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, **406**, 775-781.
- Walsh, C.T. (2002) Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chembiochem*, **3**, 125-134.
- Walsh, C.T. (2004) Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*, **303**, 805-810.
- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A. & Patel, H.M. (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 525-534.
- Waksman, S.A. & Lechevalier, H.A. (1949) *Science*, **109**, 305-307.
- Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. & Leitner, E. (1994) The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet*, **26**, 120-125.
- Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A. & Holak, T.A. (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure Fold Des*, **8**, 407-418.
- Weinig, S., Mahmud, T. & Müller, R. (2003) Markerless mutations in the myxothiazol biosynthetic gene cluster: A delicate megasynthetase with a superfluous Nonribosomal peptide synthetase domain. *Chem Biol*, **10**, 953-960.
- Wu, N., Tsuji, S.Y., Cane, D.E. & Khosla, C. (2001) Assessing the balance between protein-protein interactions and enzyme-substrate interactions in the channeling of intermediates between polyketide synthase modules. *J Am Chem Soc*, **123**, 6465-6474.
- Wyckoff, E.E., Stoeckner, J.A., Reed, K.E. & Payne, S.M. (1997) Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol*, **179**, 7055-7062.
- Yaffe, M.B. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 177-186.
- Zamenhof, P.J. & Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of beta-galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.*, **110**, 171-178.
- Zocher, R., Nihira, T., Paul, E., Madry, N., Peeters, H., Kleinkauf, H. & Keller, U. (1986) Biosynthesis of cyclosporin A: partial purification and properties of a multifunctional enzyme from *Tolypocladium inflatum*. *Biochemistry*, **25**, 550-553.

8 ANHANG

8.1 Verwendete Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 8.1 zusammengestellt. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind fett hervorgehoben.

Tab. 8.1: Oligonukleotide für die Konstruktion der Plasmide

Oligonukleotide	Oligonukleotidsequenz
5'-tycA	5'-ATG TTA GCA AAT CAG GCC AAT CTC ATC G-3'
3'-tycA	5'-TTA GCG CAG TGT ATT TGC AAG CAA TTC-3'
3'-tycA Δ 03	5'-TTA ATT TGC AAG CAA TTC GAA GAT ATC GTC-3'
3'-tycA Δ 06	5'-TTA CAA TTC GAA GAT ATC GTC CAT TTC TTC-3'
3'-tycA Δ 09	5'-TTA GAT ATC GTC CAT TTC TTC CAT TTG GAG-3'
3'-tycA Δ 12	5'-TTA CAT TTC TTC CAT TTG GAG ACC TTT GAC-3'
3'-tycA Δ 15	5'-TTA CAT TTG GAG ACC TTT GAC GCT GAA ATC-3'
3'-tycA Δ 23	5'-TTA ATC GCT GGG CGT TCG CTC TAC TTC-3'
5'-tycB1	5'-ATG AGT GTA TTT AGC AAA GAA CAA GTT CAG G-3'
3'-tycB1	5'-CTC CCC GCC TTC CAC ATA CGC-3'
5'-tycB3	5'-AAT CCG GAA AAT GAA TTG CAA GAG ATC GAG-3'
3'-tycB3	5'-TCA AAT CCA TTC CAG GAT GTT TTC CAG CTC-3'
5'-tycC1	5'-ATG AAA AAG CAG GAA AAC ATC GCA AAA ATT TAC C-3'
3'-tycC1	5'-TTC CGA CCG CGA AAG GAA GCG G-3'
5'-tycA_fusion(B3)	5'-GAG AAA AAA GAA GTA GAG CGA ACG CCC AGC GAC CTG GGG GAT GAA GAG C-3'
3'-tycA_fusion(B3)	5'-GCT CTT CAT CCC CCA GGT CGC TGG GCG TTC GCT CTA CTT CTT TTT TCT C-3'
5'-tycB3_fusion(A)	5'-CAA AAG AAG AAG GCG AGT ACA CCC CGA GCG ATT TCA GCG TCA AAG GTC TCC-3'
3'-tycB3_fusion(A)	5'-GGA GAC CTT TGA CGC TGA AAT CGC TCG GGG TGT ACT CGC CTT CTT CTT TTG-3'
5'-(C1)fusion_tycB1	5'-CAG GAT ATG TAT GCG TTG ACC CCG TTG CAA GAG GGT ATG TTG TTT CAC GCT G-3'
3'-(C1)fusion_tycB1	5'-CAG CGT GAA ACA ACA TAC CCT CTT GCA ACG GGG TCA ACG CAT ACA TAT CCT G-3'
5'-(B1)fusion_tycC1	5'-CAT CGC AAA AAT TTA CCC GCT AAC CCC AAT GCA AGA GGG GAT GCT GTT TCA CG-3'
3'-(B1)fusion_tycC1	5'-CGT GAA ACA GCA TCC CCT CTT GCA TTG GGG TTA GCG GGT AAA TTT TTG CGA TG-3'
5'-F1_COM(B1)	5'-AAA CTG CAG CCG GAA GAG ACC GAG-3'
3'-F1_COM(B1)	5'-ATC TCT AGA GTG CTC TTG ATC GAG C-3'
5'-F2_COM(A)	5'-ATC GCT AGC GAT TTC AGC GTC AAA GG-3'
3'-F2_COM(A)	5'-AAA GTC GAC TGG CGA TGG TCC-3'
3'-tycA_UKS	5'-ATT TGC AAG CAA TTC GAA GAT ATC GTC-3'
5'-BacB2	5'-AAA GCT AGC TAC AAT ATG CCT TTT GCG-3'
3'-BacB2	5'-AAA CCT AGG CGT TTT TTC GGT TTC ATG-3'
5'-tycA(A) Δ E	5'-AAA AGA TCT GAG CGA ACG CCC AGC G-3'
3'-tycA(A) Δ E	5'-TTT AGA TCT GCT CTT GAC AAA AAG AGC AAC C-3'
5'-tycA H743A_for	5'-TTT CTC GCA ATT CAT GCA TTG GTC GTC GAT GGG ATT TCC-3'
3'-tycA H743A_rev	5'-CAT CCA CGA CCA ATG CAT GAA TTG CGA GAA ACA AAT GAT CG-3'
5'-(C1)tycB1 K9D	5'-AGG AAA ACA TCG CAG ATA TTT ACC CGC TAA CCC CAT TGC-3'
3'-(C1)tycB1 K9D_rev	5'-GGT TAG CGG GTA AAT ATC TGC GAT GTT TTC CTG CTT TTC C-3'

Abb. 8.1: Biosynthesysteme. Gezeigt sind die Systeme des Tyrocidin aus *Bacillus brevis*, Gramicidin S (*Bacillus brevis*), Surfactin (*Bacillus subtilis*), Bacitracin (*Bacillus licheniformis*), 6-Desoxyerythronolid B (*Saccaropolyspora erythraea*), Epothilon (*Sorangium cellulosum*), Vibriobactin (*Vibrio cholerae*).

Abb. 8.1: Biosynthesesysteme. Gezeigt sind die Systeme des Tyrocidin aus *Bacillus brevis*, Gramicidin S (*Bacillus brevis*), Surfactin (*Bacillus subtilis*), Bacitracin (*Bacillus licheniformis*), 6-Desoxyerythronolid B (*Saccaropolyspora erythraea*), Epothilon (*Sorangium cellulosum*), Vibriobactin (*Vibrio cholerae*).

8.3 Die konservierten *core*-Motive der NRPS-Domänen

Tab. 8.2: *core*-Motive der NRPS-Domänen

Domäne	<i>core</i> -Motiv	Konsensus-Sequenz
A-Domäne	A1	L(TS)YxEL
	A2	LKAGxAAyL(VL)P(LI)D
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxGPTE
	A6	GELIxIxGx(VL)ARGYL
	A7	Y(RK)TGDL
	A8	GRxPxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
PCP-Domäne	T	LGG(DH)SL
C-Domäne	C1	SxAQXR(LM)(WY)xL
	C2	RHExLRTxF
	C3	MHHxISDG(WW)S
	C4	YxD(FY)AVW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR
	C6	(HN)QD(YD)PFE
	C7	RDxSRNPL
Te-Domäne	TE	GxSxG
E-Domäne	E1	PIQxWF
	E2	HHxISDG(WW)S
	E3	DxLLxAxG
	E4	EGHGRE
	E5	RTVGWFTxxYP(YV)PFE
	E6	PxxGxGYG
	E7	FNYLG(QR)
Cy-Domäne	Cy1	FPL(TS)xxQxAYccGR
	Cy2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	C3'	DxxxxDxxS
	Cy3	LPxxPxLPLxxxP
	Cy4	(TS)(PA)xxx(LAF)6x(IVT)LxxW
	Cy5	(GA)DFTxLxxL
	Cy6	PVVFTSxL
Ox-Domäne	Cy7	(ST)(QR)TPQVx(LI)D13xWD
	Ox1	KYxxYxSxGxxY(PG)VG
R-Domäne	Ox2	GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P
	R1	V(LF)LTGATGFLGAXLLxxLL
M-Domäne	R2	VYCLVRA
	R3	GDLxxPxLGSL
	R4	NVxGT
	R5	GYxQSKWAExxVxxAxxRGL
		GFLxxP
M-Domäne	M1	VL(DE)xGxGxG
	M2	NELsxYRYxAV
	M3	VEsxARGxGxLD

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Torsten Stachelhaus für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Seine stete Diskussionsbereitschaft und hervorragende Betreuung haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Daneben ermöglichte er mir durch den Besuch von Tagungen und Fortbildungen auch über den Tellerrand des Laboralltags hinaus zu schauen.

Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel danke ich für die Bereitschaft, das Erstgutachten zu übernehmen, sowie für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen sei an dieser Stelle für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens gedankt.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise im Fachbereich Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt meinen langjährigen Laborkollegen Dr. Thomas Dürfahrt, Dr. Jürgen May, Dr. Robert Finking, Dr. Katrin Eppelmann und Stephan Grünewald für die lockere Atmosphäre und gute Stimmung, welche die tägliche Laborarbeit zu einem angenehmen „Muss“ werden ließ. In diesem Zusammenhang seien auch die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe Stachelhaus, Claudia Chiocchini, Martina Pfeiff, Per Stehmeier und Dr. Richard Nadvornik lobend erwähnt.

Antje Schäfer, Gabriele Schimpf-Weiland, Inge Schüler und Christiane Bomm waren bei der Herstellung der Medien, SDS-Gele und den großen und kleinen Problemen des Laboralltags eine große Hilfe.

Meinen Vertiefungsstudenten Thomas Kurpiers, Christoph Eickhorst, Antje Teichert, Sebastian Koch und Andreas Schlecker danke ich für ihr Engagement und ihre aufopfernde Arbeit.

Alexandra Mees danke ich für die Messung der CD-Spektren.

Dr. Katrin Eppelmann und Dr. Thomas Dürfahrt sei an dieser Stelle für das schnelle, gründliche und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mein naturwissenschaftliches Interesse gefördert und mich in allen Bereichen liebevoll unterstützt haben. Ihnen widme ich diese Arbeit.